

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Département de Chimie physique
Département de Pharmacologie

FACULTÉ DES SCIENCES
Professeur A. Buchs
FACULTÉ DE MÉDECINE
Professeur B. Glasson

La spectrométrie d'émission dans l'étude du métabolisme des médicaments marqués à l'azote 15

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention chimique

par
Edgar BOILLAT
de
Bémont (Jura)

Thèse No 1836



Juris Druck + Verlag Zürich

1977

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Département de Chimie physique
Département de Pharmacologie

FACULTÉ DES SCIENCES
Professeur A. Buchs
FACULTÉ DE MÉDECINE
Professeur B. Glasson

La spectrométrie d'émission dans l'étude du métabolisme des médicaments marqués à l'azote 15

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention chimique

par
Edgar BOILLAT
de
Bémont (Jura)

Thèse No 1836

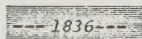


Juris Druck + Verlag Zürich
1977

La faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs
A. BUCHS, professeur ordinaire, B. GLASSON, professeur
(Faculté de Médecine), A. BENAKIS, priva-docent
(Faculté de Médecine), codirecteurs de thèse et
U. FELLER (Pflanzenphysiologisches Institut - Berne)
autorise l'impression de la présente thèse, sans
exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont
énoncées.

GENÈVE, le 26 septembre 19 77

Thèse



Le Doyen :

B. Levrat

Bernard LEVRAT



à la mémoire de ma grand-mère maternelle

à ma femme

à ma mère

Je remercie

le professeur B. Glasson, qui m'a accueilli dans son laboratoire et a accepté de diriger cette thèse,

le professeur A. Buchs, qui a bien voulu présenter cette thèse à la Faculté des Sciences,

le Dr A. Benakis, Privat-Docent de pharmacologie, qui a obtenu un subside du FNSRS pour l'achat du spectromètre d'émission et qui m'a guidé au cours de ce travail,

le Dr U. Feller, de l'Université de Berne, qui a accepté de faire partie du jury de thèse,

les Drs J. Corthay et P. Medilanski pour leur aide précieuse et leurs encouragements,

tous les membres du Laboratoire du Métabolisme des Médicaments et du Pavillon des Isotopes qui m'ont aidé pendant ce travail.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

I.	GENERALITES	1
I.1.	<u>Bref historique de ^{15}N</u>	1
I.2.	<u>L'azote 15</u>	2
I.2.1.	Les isotopes de l'azote	2
I.2.2.	Les techniques de mesures de ^{15}N	3
I.3.	<u>Aspect théorique de la spectrométrie d'émission</u>	4
I.3.1.	Etat électronique de la molécule d'azote N_2	4
I.3.2.	Le spectre d'émission de la molécule d'azote N_2	4
I.3.3.	Les niveaux d'énergie de l'azote N_2	5
I.3.4.	Le déplacement isotopique	7
I.3.4.1.	Le déplacement isotopique du spectre électronique de vibration	8
I.3.4.2.	Le déplacement isotopique du spectre électronique de rotation	9
I.3.5.	L'analyse isotopique spectrométrique de l'azote	10
I.3.6.	La tête de bande de la transition électronique de vibration 2-0 du deuxième système positif de l'azote par spectrométrie d'émission	13
I.3.7.	Le calcul de l'abondance isotopique de l'azote	15

DEUXIEME PARTIE

II.	MATERIEL ET METHODES	18
II.1.	<u>Le spectromètre d'émission analyseur de l'azote 15</u>	18
II.1.1.	Le développement du spectromètre d'émission analyseur de l'azote 15	18
II.1.2.	Le spectromètre d'émission analyseur de l'azote 15	19
II.2.	<u>Préparation des échantillons</u>	21
II.2.1.	Le tube à décharge	21

II.2.1.1.	Effet de mémoire du tube à décharge	25
II.2.2.	Pression optimale du gaz du tube à décharge pour l'émission	26
II.2.3.	Variation de la pression du gaz du tube à décharge lors de l'émission	27
II.2.4.	Dispositifs de vide pour la préparation des échantillons	28
II.2.5.	Transformation de produits azotés en azote gazeux N_2	31
II.2.5.1.	La méthode de l'hypobromite	32
II.2.5.2.	La méthode de Dumas	35
II.2.5.3.	La méthode de Dumas modifiée	36
II.2.5.4.	La méthode de Dumas modifiée avec usage de gaz rares	39
II.2.5.5.	Caractéristiques des méthodes de libération de l'azote gazeux	41
II.3.	<u>Essais et mises au point de techniques analytiques</u>	42
II.3.1.	Mesures préliminaires d'abondance d'azote 15 et amplification spécifique des pics de l'azote $^{14}N^{14}N$ et $^{14}N^{15}N$	42
II.3.2.	Différents types de spectres de l'azote	46
II.3.3.	La mesure de la hauteur des pics du spectre de l'azote	50
II.3.3.1.	Mise au point de la mesure de la hauteur des pics du spectre de l'azote	53
II.3.4.	La tension du photomultiplicateur	57
II.3.5.	Comportement du verre rasotherm des tubes à décharge en fonction de la température et de la durée de cuisson	61
II.3.6.	Essais de l'efficacité des catalyseurs de libération de N_2	61
II.3.6.1.	Selon la méthode de Dumas	61
II.3.6.2.	"Catalyseurs de libération" de N_2	64
II.3.6.3.	Limites des quantités d'azote lors de l'utilisation de la méthode de Dumas modifiée	67
II.3.7.	Méthode de Dumas modifiée avec usage de gaz rares	69
II.3.7.1.	Avec usage d'hélium	70
II.3.7.2.	Avec usage d'argon, ou d'argon/hélium	74
II.3.7.3.	Essais de la méthode de Dumas modifiée avec usage de xénon et d'hélium	74
II.3.8.	Emission différée et coloration de la luminescence	77
II.4.	<u>Droites d'étalonnage de l'abondance isotopique de l'azote</u>	79

II.4.1.	Droite d'étalonnage de l'abondance isotopique, après libération de l'azote gazeux par la méthode de NaOBr	81
II.4.2.	Droite d'étalonnage de l'abondance isotopique, de $^{15}\text{N}_2$, libéré à partir de substances minérales par la méthode de Dumas modifiée	81
II.4.3.	Droite d'étalonnage de l'abondance isotopique, de $^{15}\text{N}_2$, libéré à partir de substances organiques par la méthode de Dumas modifiée	81
II.5.	<u>Mesure de l'azote par spectrométrie de masse. Comparaison des valeurs obtenues par spectrométrie de masse avec celles obtenues par spectrométrie d'émission</u>	88
II.6.	<u>Le dosage de l'azote par dilution isotopique</u>	94
II.6.1.	Les méthodes de dilution isotopique	94
II.6.2.	Mesure du % ^{15}N d'échantillons par dilution isotopique directe et inverse	97
II.6.3.	Dosage de l'azote par dilution isotopique directe et inverse	98
II.7.	<u>La constante d'équilibre de l'azote isotopique gazeux</u>	104

TROISIEME PARTIE

III.	APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE D'EMISSION AU METABOLISME D'UN MEDICAMENT	110
III.1.	<u>Synthèse du phénobarbital-^{14}C</u>	110
III.2.	<u>Techniques de mesure de la radioactivité du carbone 14</u>	114
III.3.	<u>Techniques chromatographiques</u>	115
III.4.	<u>Techniques d'extraction</u>	117
III.5.	<u>Synthèse du phénobarbital-^{15}N</u>	118
III.6.	<u>Essais d'isolement du phénobarbital-^{15}N par chromatographie</u>	121
III.6.1.	Essais d'élution du phénobarbital- ^{15}N après chromatographie sur papier	121
III.6.2.	Essais de mesure de ^{15}N fixé sur du silica-gel	121
III.6.3.	Essais d'élution du phénobarbital- ^{15}N à partir de plaque de silica-gel	122

IV.	EXPERIENCES CHEZ LE RAT	123
IV.1.	<u>Conditions d'administration et d'expérimentation du phénobarbital chez le rat</u>	123
IV.2.	<u>Mode opératoire du dosage de l'azote en milieu biologique</u>	125
IV.2.1.	Dosage d'azote par double dilution isotopique inverse	125
V.	RESULTATS	127
V.1.	<u>Taux plasmatique du phénobarbital chez le rat</u>	127
V.2.	<u>Taux du phénobarbital de huit des principaux organes du rat</u>	129
V.3.	<u>Comparaison des dosages d'azote par dilution isotopique radioactive et par dilution isotopique de l'azote 15</u>	129
V.4.	<u>% de la dose injectée de phénobarbital par organe, chez les rats sacrifiés 1 h et 3 h après administration du produit</u>	137
V.5.	DISCUSSION	137
	CONCLUSION	142
	BIBLIOGRAPHIE	145

INTRODUCTION

L'étude du métabolisme d'une substance s'effectue, en général, à l'aide d'isotopes marqueurs, radioactifs ou stables.

Les isotopes radioactifs ont une période déterminée, une radiation dangereuse et une grande sensibilité de détection, tandis que les isotopes stables ont un temps de détection illimité, n'ont pas de radiations et sont mesurés par un pourcentage.

A cause de leur sensibilité de détection, les éléments radioactifs sont très utilisés. Cependant, l'élément stable est nécessaire lorsque ses isotopes radioactifs ont une période trop courte et lorsqu'ils sont dangereux, comme par exemple, dans l'expérimentation humaine.

C'est le cas de l'azote.

D'une part, en effet, ses isotopes radioactifs ont une période courte, et d'autre part, il entre dans la structure d'un grand nombre de molécules endogènes et exogènes des espèces supérieures; il peut donc remplacer, lors d'investigations cliniques, le marquage au ^{14}C de la substance étudiée.

L'utilisation de l'azote 15, isotope stable de l'azote naturel, s'est développé parallèlement au perfectionnement de la spectrométrie de masse, qui aujourd'hui encore est la seule technique courante de mesure de l'abondance isotopique de l'azote.

Le présent travail a pour but, à l'aide d'un nouvel appareil, le spectromètre d'émission analyseur d'azote 15 (Isocommerz Berlin) d'utiliser dans l'expérimentation biologique des produits marqués à l'azote 15.

Notre étude comporte les parties suivantes :

- Dans la première partie, nous résumons les connaissances et les techniques analytiques de l'azote 15 et les fondements théoriques de la spectrométrie d'émission.

- Dans la deuxième partie, nous présentons une évaluation de l'appareil, la mise au point de la libération de l'azote gazeux par diverses méthodes à partir d'échantillons azotés, et le dosage de l'azote.

- Dans la troisième partie, nous étudions en milieu biologique,

chez le rat, un médicament marqué à l'azote 15, le phénobarbital ¹⁵N. Nous en déterminons le taux plasmatique et le taux au niveau des principaux organes.

PREMIERE PARTIE

I. GENERALITES

I.1. Bref historique de ^{15}N

L'utilisation de ^{15}N débute vers 1934, quelques années après sa découverte par Naude (1). Son usage comme marqueur reste limité par son seuil de détection et par la difficulté de le mesurer. Aussi, son emploi généralisé ne se développe-t-il qu'avec le perfectionnement de la spectrométrie de masse, actuellement encore, la seule technique courante de détection et de mesure de ^{15}N .

L'examen de la littérature publiée jusqu'à ce jour montre que les expériences les plus nombreuses avec de l'azote 15 ont été effectuées en agriculture, en agrochimie, en botanique et en physiologie végétale.

Dans la recherche médicale et en pharmacologie, une cinquantaine de publications, jusqu'en 1970, traitent de ^{15}N . Dans presque tous les cas, il s'agit de molécules endogènes, telles l'urée, la glycine, l'acide urique, les protéines. Les seules études effectuées avec une molécule exogène de synthèse, marquée à l'azote 15 , sont celles de van Dyke et coll. en 1947 (2) qui détermine l'excrétion de l'azote 15 dans l'urine du chien, et ensuite de Maynert et van Dyke (3,4,5) qui localisent des barbituriques ^{15}N dans le système nerveux central.

Afin de montrer la grande utilité de l'azote 15 en pharmacologie, nous présentons :

1. les principales études effectuées avec de l'azote 15 et
2. nous mentionnons celles réalisées avec des molécules doublement marquées.

1. Avec de ^{15}N

- Métabolisme des protéines (Rittenberg et coll. 1939) (6)
- Métabolisme de la glycine ^{15}N et de l'acide urique ^{15}N chez l'homme sain et le patient goutteux (J.D. Benedict 1949) (7,8)
- Métabolisme et érythropoïèse chez l'homme et le chien à

l'aide de glycine ^{15}N (E.W. James 1949) (9)

- Dès 1955, les travaux sont de plus en plus nombreux. Ils traitent du métabolisme de substances endogènes, souvent lié à une maladie clinique : par exemple, les protéines, l'urée, l'acide urique, la glycine, les amines, les amino-acides, la phénylalanine, l'uracile, la créatine-urée, l'acide aspartique (10-34).

En médecine vétérinaire, signalons :

- L'excrétion d'azote ^{15}N dans l'urine du chien après absorption de glycine ^{15}N (35)
- La participation de la synthèse protéique de la glycine ^{15}N chez le rat (36)
- L'action du glutathion dans le turn-over des érythrocytes d'oiseaux (37)
- La synthèse des amino-acides et des protéines à partir d'ions ammonium, le métabolisme de l'urée, de l'acide urique, chez les ruminants (38)
- la cinétique d'absorption des amino-acides, le métabolisme de l'azote non protéique (39-41).

2. Avec des molécules doublement marquées

- Incorporation de la glycine ^{15}N et de la glycine ^{14}C dans l'acide urique d'individus sains ou malades (A.B.Gutmann) (42).
- Etude de la leucine ^{15}N et de la leucine ^{14}C (Prachnell) (43)
- Acide urique ^{15}N et acide urique ^{13}C chez le patient goutteux (Seegmiller) (44)

1.2. L'azote 15

1.2.1. Les isotopes de l'azote

Les isotopes de l'azote sont au nombre de sept dont deux sont naturels (45). Ils sont rassemblés dans le Tableau 1.

On constate que toutes les périodes des isotopes radioactifs de l'azote sont très courtes.

En fait, seul le ^{15}N présente un intérêt en tant que traceur.

Tableau 1
Les isotopes de l'azote

Isotope	Abondance naturelle	Energie de la particule (MeV)	I	Période	Décroissance
^{12}N	-	16,38	-	0,011s	β^+
^{13}N	-	1,19	1/2	-	β^+
^{14}N	99,635	-	1	-	-
^{15}N	0,365	-	1/2	-	-
^{16}N	-	10,44	-	7,2 s	β^-
^{17}N	-	8,70	-	4,16s	$\beta^-(n)$
^{18}N	-	9,40	-	0,63s	β^-

I.2.2. Les techniques de mesure de ^{15}N

Les techniques de mesure de ^{15}N , c'est-à-dire la détermination de l'abondance isotopique de ^{15}N par rapport à ^{14}N , sont basées soit sur la différence de masse de chacun de ces éléments, soit sur les propriétés physico-chimiques de leur noyau. Les plus courantes sont :

- La spectrométrie de masse, qui mesure l'abondance isotopique de l'azote gazeux N_2 ou de l'azote en tant qu'élément structural d'une molécule;
- la spectroscopie IR et RMN qui mesurent l'abondance isotopique de l'azote structural d'une molécule;
- la spectrométrie d'émission, qui mesure l'abondance isotopique de l'azote gazeux N_2 ;
- la chromatographie en phase gazeuse qui mesure l'abondance isotopique de l'azote N_2 ou de l'azote sous forme de NH_3 .

La technique que nous utilisons pour mesurer l'abondance de ^{15}N est la spectrométrie d'émission, dont nous démontrons les avantages au cours de ce travail. Son principe est le

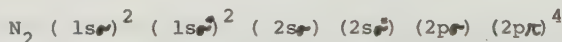
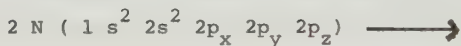
suivant :

Un tube de verre en uviol, en rasotherm ou en quartz, contenant l'échantillon gazeux d' ^{15}N est placé dans un champ à haute fréquence. Certaines couches électroniques de N_2 excitées produisent une émission lumineuse dont l'analyse spectrale fournit les spectres de $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ à 2989 Å, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ à 2983 Å et $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ à 2977 Å. L'intensité des spectres, proportionnelle à l'abondance relative de ^{15}N et de ^{14}N peut être amplifiée et mesurée. Par calcul où intervient le rapport de ces intensités et en tenant compte de la constante d'équilibre du gaz, on détermine l'abondance isotopique de l'échantillon.

I.3. Aspect théorique de la spectrométrie d'émission

I.3.1. Etat électronique de la molécule d'azote N_2

La configuration de la molécule d'azote peut se résumer ainsi :



Les orbitales atomiques s et p_z appartiennent à la même espèce de symétrie, elles peuvent être hybridées. L'hybridation donne lieu à deux nouveaux niveaux, σ qui est une orbitale à prédominance de caractère s avec quelque caractère p_z et σ^* , à prédominance p_z avec quelque caractère s.

I.3.2. Le spectre d'émission de la molécule d'azote N_2

Les études initiales du spectre d'émission de l'azote gazeux N_2 ont été effectuées surtout par Herzberg (46) avec un tube de Geissler (Figure 1). Celui-ci contient le gaz sous une pression de quelques mm. de mercure. A l'intérieur du tube sont soudées deux électrodes E entre lesquelles on maintient une différence de potentiel de plusieurs dizaines de milliers de volts pour que la décharge autonome se produise. C'est la

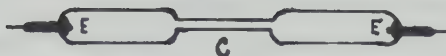


Figure 1
Le tube de Geissler.

colonne positive qui est la plus lumineuse. La luminescence du tube est grande dans la partie capillaire C. L'excitation par l'action d'un champ électrique peut encore s'obtenir de façon simple en plaçant le tube transparent contenant le gaz dans un solénoïde faisant partie d'un circuit oscillant à haute fréquence, entretenu par un triode. L'azote gazeux excité émet des radiations. Celles-ci après passage à travers un prisme sont diffractées selon leur longueur d'onde et forment le spectre d'émission de l'azote. Ce dernier est enregistré par noircissement d'un film par l'émission de lumière. Le spectre obtenu comprend plusieurs régions, dans lesquelles on distingue diverses bandes, dégradées vers les courtes longueurs d'ondes, et ayant vers les grandes longueurs d'onde un bord net, appelé tête de bande ou arête. L'ensemble forme un système de bandes. Les séries de bandes sont associées à des changements variés de l'énergie de vibration qui peut accompagner une transition électronique pure. Lorsque l'on augmente le pouvoir de résolution du spectrographe, on observe que chacune des bandes précédentes est résoluble en raies. Ces bandes sont donc constituées de raies de rotation très proches les unes des autres et qui convergent d'un côté vers la tête de bande.

I.3.3. Les niveaux d'énergie de l'azote N_2

L'analyse du spectre d'émission de l'azote a permis de déter-

miner ses différents niveaux d'énergie et ses différents états électroniques. Ils sont répartis en plusieurs groupes positifs ou négatifs, selon leur apparition au pôle positif ou négatif, soit du tube de Geissler, soit d'un arc électrique. Ces groupes sont très nombreux et nous ne mentionnerons que les deux groupes positifs principaux.

Le premier groupe positif. Il est dégradé vers le violet. L'apparence, sous faible dispersion, est de triples têtes de bandes régulièrement espacées et fortement colorées dans l'orange, le rouge et le jaune-vert. Les bandes principales apparaissent dans le jaune-rouge. La transition est $B^3\pi_g \rightarrow A^3\pi_u$.

Le deuxième groupe positif. Il est dégradé vers les plus courtes longueurs d'ondes, et formé de têtes de bandes triples rapprochées. La transition est $C^3\pi_u \rightarrow B^3\pi_g$. La coloration caractéristique du groupe est dans le bleu-violet.

La figure 2 donne le diagramme des principaux niveaux d'énergie de l'azote. Les lignes horizontales épaisses indiquent les états électroniques et les lignes fines les niveaux vibrationnels, les traits pointillés les énergies de prédisso- ciation de la molécule. Par convention, à gauche du diagramme se trouvent les états singulets et, à droite, légèrement dé- calés, les états triplets. L'état fondamental est désigné par X; les états excités de même multiplicité par A, B, C, pour les triplets et a, b, c, pour les singulets. L'ordre A, B, C, est fonction de l'énergie croissante. Le niveau d'énergie su- périeur ultime d'un groupe est caractérisé par le dernier seuil énergétique avant la dissociation de la molécule.

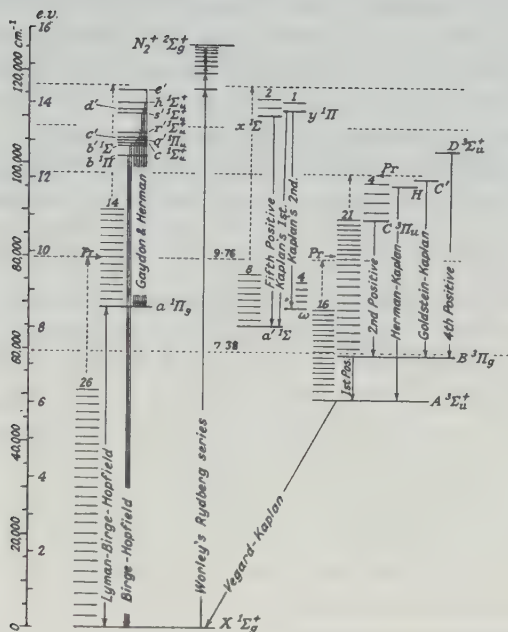


Figure 2

Diagramme du niveau d'énergie de l'azote N_2^+ . (selon Herzberg)
Spectra of Diatomic molecules

1.3.4. Le déplacement isotopique

Les fonctions de l'énergie potentielle pour deux molécules diatomiques, une qui est isotopique et l'autre homonucléaire, sont identiques, avec une très bonne approximation, étant donné qu'elles dépendent seulement du mouvement des électrons et de la répulsion coulombienne des noyaux. Cette dernière

est d'ailleurs totalement indépendante de la modification de la masse des noyaux, et le mouvement des électrons en dépend très peu. C'est pour cette raison que la forme et la position relative des courbes de potentiel correspondant à des états électroniques différents sont les mêmes pour deux molécules isotopiques. La différence de masse influence seulement l'énergie de vibration et de rotation de la molécule isotopique dans chaque état électronique. En effet, la masse réduite de la molécule intervient dans l'équation du nombre d'onde de vibration et de rotation; lors d'une oscillation on a :

$$G(v) = w(v + \frac{1}{2}) - w_e x_e (v + \frac{1}{2})^2 + w_e y_e (v + \frac{1}{2})^3 + \dots \quad (1)$$

$$\text{où } w_e = \frac{V_{011}}{c}$$

$$\text{et } V_{011} = \frac{1}{2} \pi \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} = \text{masse réduite}$$

k = cte de force

lors d'une rotation, on a

$$F = B J(J+1) - DJ^2(J+1)^2 + \dots \quad (2)$$

où :

G : énergie de vibration de la molécule

F : énergie de rotation de la molécule

B et D : constantes

v : nombre quantique de vibration

J : nombre quantique de rotation

w_e, x_e : constantes

I.3.4.1. Le déplacement isotopique du spectre électronique de vibration

En restreignant, pour simplifier, nos considérations à la molécule non rotative, on obtient pour les systèmes de bandes de deux molécules isotopiques

$$V = V_e + w^-(v' + \frac{1}{2}) - w_e^- x_e^-(v' + \frac{1}{2})^2 - \quad (3)$$

$$[w_e^-(v'' + \frac{1}{2}) - w_e^- x_e^-(v'' + \frac{1}{2})^2]$$

$$\text{où } g = \sqrt{\frac{\mu}{\mu_i}}$$

$$V^i = V_e + g w^-(v' + \frac{1}{2}) - g^2 w_e^- x_e^-(v' + \frac{1}{2})^2 -$$

$$[g w_e^-(v'' + \frac{1}{2}) - g^2 w_e^- x_e^-(v'' + \frac{1}{2})^2] \quad (4)$$

L'indice i mentionne la molécule isotopique.

ν_e est la différence en énergie du minimum de la courbe de potentiel des deux états électroniques concernés et qui est la même avec une bonne précision pour les deux molécules isotopiques.

Les équations 3 et 4 peuvent être écrites

$$\nu = \nu_e + \nu_v \quad \nu^i = \nu_e + g\nu_v$$

si g^2 dans le terme avec $(v+\frac{1}{2})^2$ est remplacé par g . Cela n'introduit pas une grande erreur, puisque ce terme est petit comparé au terme linéaire en $(v+\frac{1}{2})$ et puisque g est habituellement très proche de l'unité. On peut donc remarquer que le système de bande de la molécule isotopique plus lourde est contracté comparé à la molécule plus légère, approximativement d'un facteur constant $g = \sqrt{\frac{P}{P_i}}$ plus petit que 1.

Ainsi la relation 4 donne la valeur du déplacement isotopique du spectre électronique de vibration

$$\Delta \nu_v = \nu' - \nu'' = w_e'(v'+\frac{1}{2})(1-g) - w_e''x_e'(v'+\frac{1}{2})^2(1-g^2) - [w_e''(v''+\frac{1}{2})(1-g) - w_e''x_e''(v''+\frac{1}{2})^2(1-g^2)] \approx (1-g)\nu_v \quad (5)$$

Cette relation est valable pour un spectre de rotation nul ($J'=J''=0$), c'est-à-dire qu'elle peut être appliquée à la tête de bande de vibration, si le déplacement des termes de rotation est négligeable.

I.3.4.2. Le déplacement isotopique du spectre de rotation

La valeur de la masse réduite de la molécule intervenant dans le phénomène de rotation, les constantes de rotation de deux molécules isotopiques diffèrent, comme suit

$$\begin{aligned} B_{e1}^1 &= g^2 B_e^2 \\ \alpha_{e1}^1 &= g^3 \alpha_e^3 \\ \beta_{e1}^1 &= g^5 \beta_e^5 \\ D_{e1}^1 &= g^4 D_e^4 \end{aligned} \quad (6)$$

En utilisant les expressions 2 et 6 pour un déplacement isotopique de rotation, on obtient :

$$\Delta \nu_r = \nu_r - \nu_r^i = (F' - F'') - (F'^i - F''^i) = \quad (7)$$

$$(1-g^2) [B_e' J'(J'+1) - B_e'' J''(J''+1)] - (1-g^3) [\alpha_e' (v'+\frac{1}{2}) J'(J'+1) - \alpha_e'' (v''+\frac{1}{2}) J''(J''+1)] - (1-g^4) [D_e' J'^2(J'+1)^2 - D_e'' J''^2(J''+1)^2]$$

Cette relation a un caractère général, même dans le cas d'un spectre de bande électronique. Le second et le troisième terme sont en général très petits, comparés au premier. On peut donc poser avec une bonne approximation

$$B_e = B_e'' \quad \alpha_e' = \alpha_e'' \quad \text{et } D_e' = D_e''$$

$$\Delta \nu_r = (1-g^2) \nu_r \quad (8)$$

en réalité

$$\Delta \nu_r \ll \Delta \nu$$

Pour une explication plus poussée des phénomènes physico-chimiques du déplacement isotopique, nous recommandons l'ouvrage de Herzberg : spectra of diatomic molecules réf.46.

I.3.5. L'analyse isotopique spectrométrique de l'azote

C'est la présence de l'effet isotopique dans le spectre de bande de l'azote qui a conduit à la découverte de l'isotope lourd, vers 1930. Ensuite Hoch et Weisser en 1950 (47) puis Broida et Chapman en 1958 (48) enfin Faust (49, 50, 51) et Meier et Müller (52, 53, 54) développèrent la détermination des concentrations relatives de ^{14}N et ^{15}N par spectrométrie. L'étude de l'azote n'est pas possible par ses seules vibrations ou rotations, car N_2 ne possède pas de moment de dipôle permanent. Une excitation plus grande par un mécanisme d'excitation non sélectif, comme un champ électromagnétique est donc nécessaire. L'azote gazeux contenu dans un tube à décharge scellé et placé dans un champ électromagnétique de haute fréquence, émet une luminescence intense qui provient des transitions électroniques du premier et du deuxième système positif de

la molécule d'azote. La transition du deuxième système positif de l'azote est particulièrement facile à obtenir. Sa luminescence est située dans le proche ultraviolet; c'est celle utilisée pour l'analyse isotopique de l'azote. Elle a lieu à partir du niveau supérieur $C^3\Pi_u$ au niveau inférieur $B^3\Pi_g$. Il s'agit d'une transition entre deux états triplets. Le deuxième système positif de l'azote possède plusieurs têtes de bandes correspondant aux divers niveaux vibrationnels des deux états électroniques concernés. Cependant, seuls un certain nombre de têtes de bande de transitions électronique de vibration sont utilisables pour l'analyse isotopique. Elles sont déterminées par trois facteurs.

1. Leur intensité
2. Une séparation suffisante
3. L'interférence avec le spectre de substances non désirées, telles H_2 , O_2 , CO , CO_2 , H_2O , NO_2 etc. qui doit être évitée.

Les principales transitions électroniques de vibration du deuxième système positif de l'azote utilisées par divers auteurs pour l'analyse isotopique sont les suivantes :

- la transition électronique de vibration 1-0. Hoch et Weisser (47) puis Broida et Chapman (48) utilisèrent la tête de bande à 3159 Å pour l'azote $^{14}N_2$ et à 3162 Å pour $^{14}N^{15}N$. Les résultats des mesures d'abondance jusqu'à 10 % de ^{15}N furent particulièrement exacts. Cependant dans leur courbe de correction, ils durent tenir compte d'un bruit de fond, dû à la présence de molécules résiduelles de H_2 , O_2 , CO , H_2O .
- la transition électronique de vibration 0-2. Utilisée par Seiler et Werner (55), la tête de bande de l'azote $^{14}N_2$ se trouve à 3805 Å, celle de $^{14}N^{15}N$ à 3796 Å, et celle de $^{15}N_2$ à 3789 Å.
- la transition électronique de vibration 2-0. C'est celle que nous utilisons pour nos analyses. G.Meier et G.Müller (53) montrèrent qu'elle n'interfère pas avec le spectre des groupes OH, comme ceux de la vapeur d'eau par exemple, mais qu'elle peut comporter un léger recouvrement de $^{14}N_2$ avec CO .

La figure 3 donne les spectres de l'azote à 10 % ^{15}N , du CO , et des groupes OH de la vapeur d'eau, entre 2930 et 4000 Å.

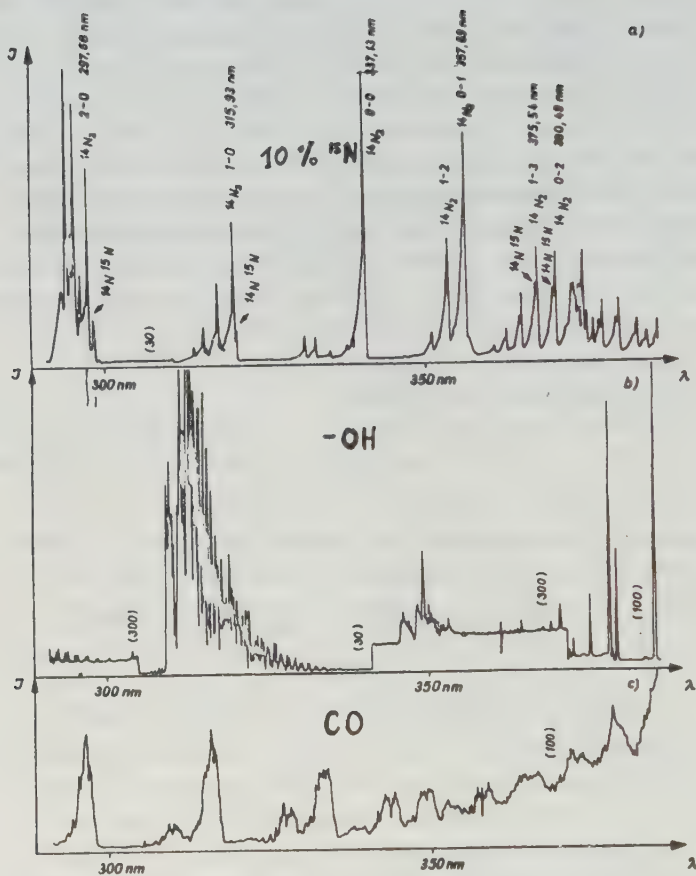


Figure 3

Spectres d'émission entre 290 et 400 nm de

- l'azote à 10 % de ^{15}N
- des groupes OH
- du CO

selon Meier et Müller.

On constate que la tête de bande 1-0 interfère avec le spectre des groupes OH, mais pas avec le spectre du CO.

Le tableau 2 résume les caractéristiques des principales têtes de bandes de transitions électroniques de vibrations du deuxième système positif de l'azote utilisables pour l'analyse isotopique.

Tableau 2

Têtes de bandes du deuxième système positif de l'azote.

2ème système positif de l'azote $C^3\pi_u \rightarrow B^3\pi_g$							
Transition	$\Delta\nu$	Longueur d'onde du spectre ($^{14}N_2$) [Å]	déplacement isotopique		I	Interférence avec	
			$\lambda(^{14}N^{15}N) - \lambda(^{14}N_2)$	$\lambda(^{15}N_2) - \lambda(^{14}N_2)$		CO	H ₂ O
2 $\rightarrow$ 0	+ 2	2976,8	+6,10	+11,82	6	+	-
1 $\rightarrow$ 0	+ 1	3159,3	+3,60	+ 6,86	9	-	+++
0 $\rightarrow$ 0	0	3371,3	+0,11	+ 0,20	10	+	-
0 $\rightarrow$ 1	- 1	3576,9	-3,64	- 7,75	10	++	++
0 $\rightarrow$ 2	- 2	3804,9	-8,35	-16,20	10	++	++
0 $\rightarrow$ 3	- 3	3755,4	-7,27	-14,10	8	?	?

I = intensité relative

+ = peu d'interférence

+++ = beaucoup d'interférence

La tête de bande 2-0 présente le meilleur compromis entre la séparation des spectres $^{14}N_2$, $^{14}N^{15}N$, $^{15}N_2$, l'intensité de ces spectres et leurs interférences avec ceux de CO et H₂O.

I.3.6. Tête de bande de la transition électronique de vibration 2-0 du deuxième système positif de l'azote par spectrométrie d'émission.

L'enregistrement de la figure 4 représente l'exemple type de la

La hauteur des pics correspond à l'intensité de l'émission.
 Pour simplifier, nous notons par a, la hauteur du pic de $^{14}\text{N}_2$, b, la hauteur du pic de $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$, c, la hauteur du pic $^{15}\text{N}_2$.

La figure 5 montre l'enregistrement d'un spectre où l'un des pics a été amplifié par rapport aux autres.

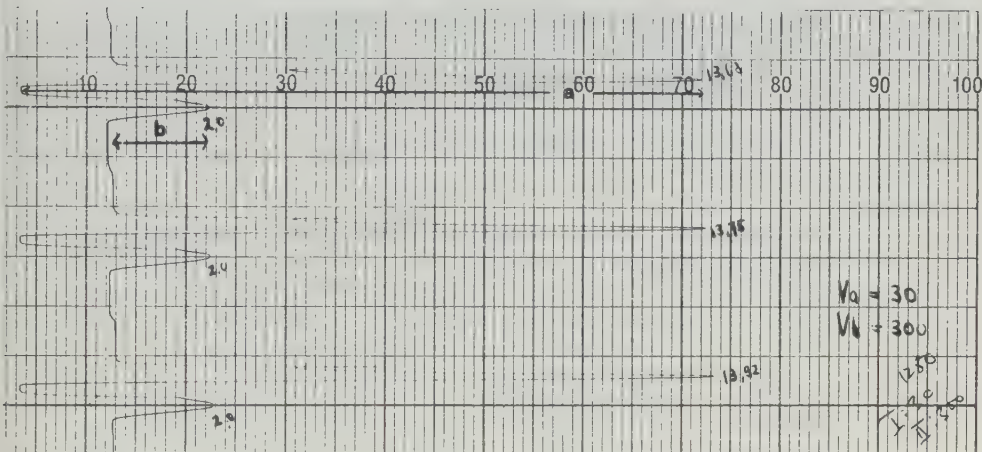


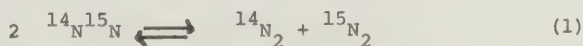
Figure 5

Enregistrement du spectre de l'azote. Le pic de $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ a été amplifié.

Le terme V signifie l'amplification. Accompagné des indices a, b, c, il montre quel pic est amplifié. Le chiffre qui suit le terme indicé indique le facteur d'amplification.

I.3.7. Calcul de l'abondance isotopique de l'azote

L'azote gazeux d'un mélange isotopique a l'équilibre suivant :



On peut par conséquent poser

$$C_l + C_s = 1$$

C_l : fraction atomique de l'isotope léger

C_s : fraction atomique de l'isotope lourd

globalement :

$$[^{14}\text{N}_2] + [^{14}\text{N}^{15}\text{N}] + [^{15}\text{N}_2] = 1 \quad (2)$$

où $[]$ est la concentration de l'élément

$$C_l = [^{14}\text{N}_2] + \frac{1}{2} [^{14}\text{N}^{15}\text{N}] \quad (3)$$

$$C_s = [^{15}\text{N}_2] + \frac{1}{2} [^{14}\text{N}^{15}\text{N}]$$

Au moment de l'établissement de l'équilibre, l'égalité suivante est remplie :

$$\frac{[^{14}\text{N}^{15}\text{N}]^2}{[^{14}\text{N}_2] [^{15}\text{N}_2]} = 4 \quad (4)$$

La valeur de la constante d'équilibre est stable pour des températures jusqu'à 1000 °C.

Ces relations permettent d'établir l'abondance des isotopes de l'azote en mesurant la hauteur des pics du spectre. Trois calculs de l'abondance de ^{15}N sont utilisés, selon que l'on considère, soit l'intensité des pics $^{14}\text{N}_2$ et $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$, soit celle des pics $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ et $^{15}\text{N}_2$. Ces calculs sont choisis en fonction de l'intensité des pics du spectre et conviennent pour des valeurs d'abondance isotopique déterminées.

1. Détermination de l'abondance d'azote 15 par mesure de l'intensité des pics $^{14}\text{N}_2$ et $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$:

$$C_s = ^{15}\text{N} \text{ (atome \%)} = \frac{100}{2 R + 1}$$

$$\text{où } R = \frac{a.Vb}{b.Va}$$

Généralement, cette méthode s'applique aux abondances isotopiques inférieures à 40 % d'azote 15.

2. Détermination de l'abondance d'azote 15 par mesure de l'intensité des pics $^{14}_{N}^{15}N$ et $^{15}N_2$.

$$Cs = ^{15}N \text{ (atome \%)} = \frac{100}{\frac{R'}{2} + 1}$$

$$\text{où } R' = \frac{b.Vc}{c.Vb}$$

Cette méthode est appliquée pour des abondances isotopiques supérieures à 40 % d'azote 15. En effet, au-dessus de cette valeur les pics $^{14}_{N}^{15}N$ sont importants.

3. Détermination de l'abondance d'azote 15 par mesure de l'intensité des pics $^{14}_{N_2}$, $^{14}_{N}^{15}N$, $^{15}N_2$.

$$Cs = ^{15}N \text{ (atome \%)} = \frac{(c + 2b) 100}{2 (a + b + c)}$$

Cette méthode est utilisée lorsque les pics respectifs sont d'importance relativement égale.

DEUXIEME PARTIE

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Le spectromètre d'émission analyseur de l'azote 15

II.1.1. Développement du spectromètre d'émission analyseur de l'azote 15.

C'est en 1938 que la spectrométrie d'émission fut utilisée la première fois, par Kruger (56), pour déterminer l'abondance de l'isotope lourd dans l'azote naturel.

Dès 1950, Hoch et Weisser (47) déterminèrent l'abondance isotopique de toute une gamme d'échantillons diversément enrichis en azote 15. Le tube à décharge en verre était supporté par deux électrodes extérieures en cuivre, l'excitation du gaz étant entretenue par un circuit oscillant. La luminescence, focalisée par des lentilles en quartz, était envoyée sur la fente d'un spectrographe comportant un prisme de résolution moyenne. Le spectre de bande était enregistré sur film. L'analyse de l'intensité des spectres du film était fastidieuse, et dépendait de nombreux paramètres.

En 1958, H.P.Broida et M.Chapman (48) utilisèrent le même principe de mesure, mais l'émission était détectée par un photomultiplicateur, amplifiée et enregistrée à la plume. A partir de 1960, Meier et Müller (52, 53, 54) ont perfectionné tous les éléments de l'appareillage de l'analyseur d'azote 15, particulièrement le prisme de diffraction; chacun des pics du spectre pouvait être amplifié. Ils ont permis la mise au point de l'appareil commercialisé que nous utilisons le "Statron Analyser NOI 15".

II.1.2. Le spectromètre d'émission analyseur de l'azote 15 (Statron
15 N Analysator NOI 15)

Ce spectromètre est constitué des éléments principaux suivants, dont la figure 6 donne une description schématique.

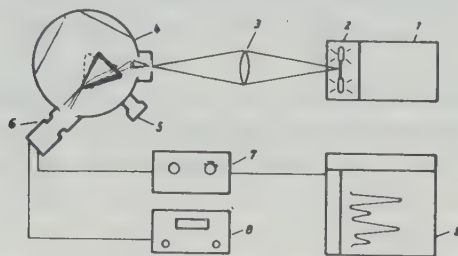


Figure 6

Principe du spectromètre d'émission analyseur de l'azote 15.

Le générateur. Le générateur haute fréquence (1) excite les couches électroniques de l'azote gazeux scellé dans un tube à décharge (2) en verre uviol, rasotherm ou quartz, sous une pression de 3-5 mm de mercure, et engendre une luminescence dont l'amplitude est modulée à environ 180 Hz. La puissance du générateur est de 50 W. Une fréquence de 27,12 MHz est imposée aux appareils industriels, afin de ne pas interférer avec les émissions radio et télévision.

La partie optique. La lumière émise passe par une lentille convergente en quartz (3), ayant un foyer de 80 mm, et est envoyée sur la fente d'entrée du monochromateur à miroir (4). Cette fente d'entrée, haute de 3mm, a été calculée de telle manière que le plus grand gain d'énergie de la largeur de la bande spectrale soit atteint, c'est-à-dire que la fente d'entrée = la fente de sortie = 0,04 mm. Le monochromateur à miroir, qui peut être ajusté dans trois directions différentes, fait bloc avec un prisme de NaCl taillé à 56°. Ce dernier est très hygroscopique. Il nécessite une substance dessicatrice constamment renouvelée dans son voisinage. Il diffracte les longueurs d'onde d'environ 3-4 nm/nm.

Le photomultiplicateur. Derrière la fente de sortie du monochromateur se trouve un photomultiplicateur (6) qui transforme le signal lumineux en signal électrique proportionnel. Le courant anodique du photomultiplicateur est amplifié, redressé à la phase et enregistré par un enregistreur à compensation (9). Le photomultiplicateur de type M 12 FQS 35 possède une fenêtre en quartz.

L'appareil à haute tension (8) fournit au photomultiplicateur le courant à haute tension. Il est réglable en permanence à l'aide d'un potentiomètre normal et d'un potentiomètre fin.

La roue dentée. Une roue dentée (5) entraîne la rotation du disque supportant le prisme NaCl-56° , de manière à faire tomber successivement la lumière des têtes de bandes sur la cathode du photomultiplicateur. L'entraînement automatique de la roue dentée est réglé pour que le monochromateur diffracte, durant des périodes d'environ une minute, les longueurs d'onde de 297 à 299 nm, dans lesquelles se trouvent les têtes de bandes des molécules $^{14}\text{N}_2$, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}_2$.

L'amplificateur et commutateur de gamme (7). Il amplifie les signaux de sortie du photomultiplicateur, de telle manière que l'enregistrement des spectres puisse se faire par un enregistrement à compensation.

Comme la grandeur des signaux correspond au rapport des concentrations, elle peut varier dans un domaine de valeur de 1:100 de telle manière que les têtes de bandes puissent être amplifiées de façon distinctes. Aux domaines de longueurs d'onde de 297-298 nm et de 298-299 nm sont attribués les amplificateurs respectifs Va et Vb. Chaque amplificateur possède neuf degrés désignés par les facteurs 1,3,10,30,100,300,1000,3000,10000, qui correspondent à des amplifications relatives.

Les amplifications relatives de Va et Vb peuvent être présélectionnées. La commutation entre Va et Vb est automatique; elle est couplée avec la roue dentée déplaçant le monochromateur.

L'enregistreur. Nous utilisons un enregistreur potentiométrique Servogor RE 511 (Goerz Electro G.m.b.H. Wien) ayant les caractéristiques suivantes :

temps de montée 0,8 s.
impédance d'entrée 1 MOhm
déroulement du papier 30 mm/min.
largeur de l'enregistrement 200 mm.

II.2. Préparation des échantillons

II.2.1. Le tube à décharge

Le choix d'un tube à décharge est fonction de plusieurs facteurs :

- la forme, qui peut influencer l'intensité de l'émission lumineuse.
- la qualité du verre (quartz, uviol, rasotherm, pyrex, supremax) qui doit être perméable au proche ultraviolet, et qui peut présenter un certain coefficient d'absorption et de diffraction des longueurs d'ondes utilisées.
- la température maximale supportée par le verre, liée aux techniques de libération de l'azote gazeux.
- l'effet de mémoire du verre
- le prix

Peu de travaux comparent les différents types de tubes à décharge et la qualité du verre.

Ferraris et Proksch (57) ont testé trois types de tubes à décharge, représentés dans la figure 7.

Le tube *a* est en quartz. Il a une contenance de 0,26 ml environ. Lors d'une stimulation haute fréquence, la durée de la luminescence d'un échantillon d'azote est relativement courte. Pour une pression d'azote de 2-3 torr, elle est de l'ordre de trente minutes.

Le tube *b*, en verre uviol, a un volume de 2,2 ml. La durée d'une luminescence est d'environ cinq heures.

Le tube *c*, est utilisé pour les standards d'azote 15, fournis par le constructeur du spectromètre d'émission analyseur d'azote 15. (Statron, Leipzig, DDR).

T.P.Stein et coll. (58) affirment que l'intensité de la luminescence est partiellement fonction du diamètre de rétrécisse-

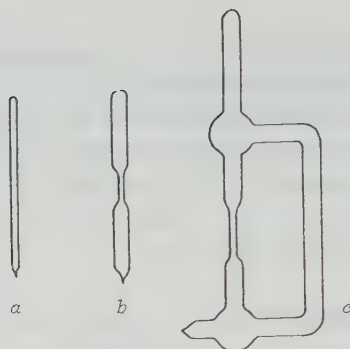


Figure 7

Différents types de tubes à décharge.

ment (1 cm de long) du capillaire. Avec des capillaires d'un diamètre inférieur à 1 mm, l'intensité du signal augmente, mais si le diamètre est inférieur à 0,5 mm, il n'y a pas de décharge de long du rétrécissement du tube.

D. Keeney et Tedesco (59) ont mesuré la transmission UV du verre Vycor et uviol. Ils trouvèrent que celle-ci est d'environ 50 % plus grande pour les tubes en vycor que pour ceux en uviol. Quant au bruit de fond, il était plus bas avec les tubes vycor, ce qui augmente la précision des mesures. Ils constatèrent qu'avec des tubes en pyrex, une déviation considérable, de l'ordre de ± 10 % existe entre des analyses répétées. L'intensité du spectre est diminuée, la durée de l'émission raccourcie et les effets de mémoire nombreux. Le manque de reproductibilité fut étudié en fonction de l'épaisseur de la portion capillaire du tube à décharge; le pyrex ne peut être utilisé que pour des mesures semi-quantitatives.

Des analyses répétées avec des tubes à décharge en vycor et en quartz donnent des résultats très reproductibles, non tributaires de la dimension des capillaires et sans effets de mémoire.

G.Müller (60) s'est livré à une étude approfondie de l'excitation des tubes à décharge en quartz, verre uviol et verre rasotherm pour les transitions 2-0 et 1-0 du deuxième système positif de l'azote. Le tableau 3 donne le coefficient d'extinction et la transmission relative des différents verres,

pour deux épaisseurs de parois, aux longueurs d'onde d'analyse de l'azote.

Tableau 3
Coefficients d'extinction et transmissions relatives des verres selon Müller

Tube	ϵ, mm^{-1}	transition 2-0		transition 1-0		
		transm. rel.		ϵ, mm^{-1}	transm. rel.	
		e=0,5mm	e=1,0mm		e=0,5mm	e=1,0mm
Quartz	0,102	1	1	0,097	1	1
Uviol	1,70	0,23	0,45	1,45	0,29	0,51
Rasotherm	2,65	0,08	0,28	1,80	0,18	0,43

e = épaisseur de la paroi

Les transmissions relatives des verres uviol et rasotherm présentent des variations selon l'épaisseur des parois du tube à décharge et de la longueur d'onde utilisée.

Des différences de transmission existent également pour des longueurs d'onde séparées de quelques dixièmes de nm; il est donc intéressant de connaître ces variations pour les têtes de bandes de $^{14}\text{N}_2$ et $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ pour les transitions 2-0 et 1-0, car le rapport de leurs intensités, intervient dans le calcul de l'abondance isotopique.

Le tableau 4, établi par Müller, donne pour des tubes à décharge à 1 mm d'épaisseur, le gradient d'extinction $\Delta\epsilon = \epsilon_{21} - \epsilon_{22}$ des têtes de bandes des masses 28 et 29 de l'azote pour les transitions 2-0 et 1-0, ainsi que leurs différences d'extinction.

Tableau 4

Gradient et différence d'extinction des têtes de bande des transitions 2-0 et 1-0 de $^{14}\text{N}_2$ et $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ avec tube à décharge de 1 mm d'épaisseur. Selon Müller.

Matériau	transition 2-0		transition 1-0	
	$\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \cdot \text{mm}^{-1} \text{ nm}^{-1}$	$\Delta\varepsilon \cdot \text{mm}^{-1}$	$\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \cdot \text{mm}^{-1} \text{ nm}^{-1}$	$\Delta\varepsilon \cdot \text{mm}^{-1}$
Quartz	$-4,3 \cdot 10^{-4}$	$+2,6 \cdot 10^{-4}$	$-2,6 \cdot 10^{-4}$	$+9,4 \cdot 10^{-5}$
Uviol	$-2,5 \cdot 10^{-2}$	$+1,5 \cdot 10^{-2}$	$-6,3 \cdot 10^{-3}$	$+2,2 \cdot 10^{-3}$
Rasotherm	$-7,1 \cdot 10^{-2}$	$+4,3 \cdot 10^{-2}$	$-3,0 \cdot 10^{-2}$	$+1,1 \cdot 10^{-2}$

La formule de détermination de l'abondance d'azote 15 est :

$$\% \text{ } ^{15}\text{N} = \frac{100}{2R + 1}$$

Si l'on pose que R_0 est le rapport des intensités $^{14}\text{N}_2 / ^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ du plasma gazeux à l'intérieur du tube à décharge et R ce même rapport après passage de la luminescence à travers l'épaisseur e de la paroi du tube à décharge, la loi de Lambert-Beer donne

$$R = R_0 \cdot e^{-\Delta\varepsilon d}$$

et pour de petites valeurs d'extinction, comme c'est le cas dans la pratique, on obtient

$$\frac{R_0 - R}{R_0} = \frac{\Delta R}{R} = \Delta\varepsilon \cdot d$$

Si l'on effectue les différentiations dc et dR que l'on introduit dans l'équation précédente, on obtient

$$\frac{C_0 - C}{C_0} = \frac{\Delta C}{C_0} = (1 - 0,01 C_0) \Delta\varepsilon \cdot d$$

Les symboles C_0 et R_0 correspondent aux symboles C et R.

En conclusion, le tube à décharge rasotherm que nous utilisons pour nos analyses de routine a une transmission lumineuse de 50 % par rapport au quartz pour une paroi de 1 mm d'épaisseur. Il a un gradient d'extinction minime pour la transition 2-0 du deuxième système positif de l'azote. Il supporte des températures de l'ordre de 580 °C et il est meilleur marché que le quartz.

	capillaire
	Ø intérieur 1,5-2mm
Epaisseur de	épaisseur de la paroi
la paroi 1 mm	0,3-0,5 mm

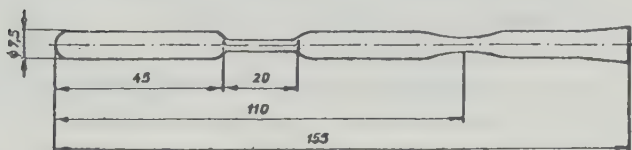


Figure 8

Caractéristiques du tube à décharge en verre rasotherm.

II.2.1.1. Effet de mémoire du tube à décharge (59)

L'azote peut être absorbé sur les parois du tube à décharge et diffuser à l'intérieur du verre. Relâché lors d'une analyse, il peut fausser la valeur d'un résultat.

En spectrométrie de masse, aucun problème spécial n'a été rapporté à ce sujet. Un pompage sous vide suffisant avant l'introduction d'un prochain échantillon gazeux ne provoque pas par la suite la libération d'azote non désiré à partir des parois en verre du récipient. Faust trouva qu'en chauffant au jaune le tube à décharge, il réduisait la dilution de l'azote 15 par l'azote 14. Ce dernier provenait de l'air adhérent aux parois du tube.

Le problème est différent pour un tube ayant déjà subi une décharge haute fréquence. Malgré le peu d'informations qui existent sur ce sujet, il semble, que lors de la décharge haute fréquence, de l'azote actif soit formé, qui s'absorberait et réagirait avec le verre. Le mécanisme d'absorption ou de réac-

tion n'est pas connu. Selon Goleb et Middelboe (61), l'azote réagit chimiquement ou physiquement avec le verre. Il est probable que l'azote se rééquilibre avec l'azote du tube à décharge lors d'une luminescence. Keeney et Tedesco (59) étudièrent l'effet de mémoire des tubes en vycor et en quartz. Ils démontrèrent qu'en utilisant le même tube après un enrichissement préalable plus élevé, on constate un effet de mémoire. Après de nombreux essais, effectués par quatre procédés différents :

- a) décharge dans une atmosphère d'argon
- b) chauffage à 700 °C pendant 12 heures
- c) chauffage en atmosphère d'argon
- e) prétraitements chimiques

ils concluent que seule la méthode b préserve efficacement des effets de mémoire. Cependant, Leickman (62) n'a pas observé d'effet de mémoire lorsqu'un échantillon d'abondance naturelle est mesuré avec un tube à décharge utilisé lors de l'analyse à 10 % de ^{15}N .

Pour réduire les sources d'erreurs, nous utilisons uniquement des tubes à décharge vierges que nous chauffons sous vide au chalumeau avant d'introduire ou de libérer l'azote gazeux à analyser.

II.2.2. Pression optimale du gaz du tube à décharge pour l'émission

La qualité et la géométrie du tube à décharge, ainsi que la fréquence d'excitation sont, comme nous l'avons mentionné précédemment, des facteurs qui influencent l'intensité de l'émission lumineuse (63). L'intensité absolue du spectre d'un gaz dépend cependant du choc des molécules et de l'équilibre thermique. L'émission lumineuse est ainsi dépendante de la pression de l'azote à l'intérieur du tube à décharge; il existe donc une pression optimale d'émission pour une fréquence et une stimulation à puissance constante.

La figure 9 montre la variation de l'intensité lumineuse relative en fonction de la pression à l'intérieur du tube à décharge. Le gaz est de l'azote, sans aucun autre élément de soutien de l'émission.

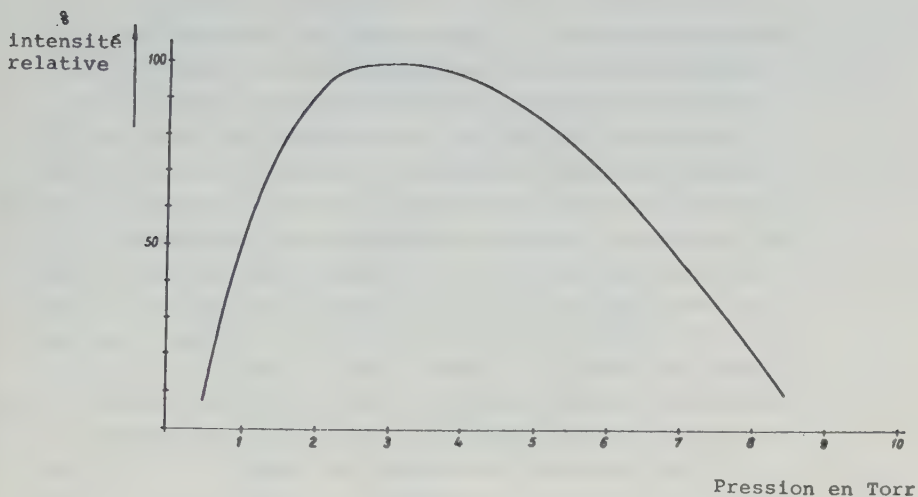


Figure 9

Intensité relative de l'émission de l'azote en fonction de sa pression. Selon Faust.

On constate que la pression optimale du gaz dans le tube à décharge se situe entre 2,5 et 4,5 torr.

II.2.3. Variation de la pression du gaz du tube à décharge lors de l'émission

La pression à l'intérieur d'un tube à décharge peut varier lors de l'émission. Lorsque la pression s'élève, la fréquence des chocs des particules peut devenir très importante, de sorte que la fréquence d'émission augmente, et que la tension du générateur ne suffit plus pour élever l'énergie d'excitation des électrons. Alors, l'intensité de l'émission diminue fortement et la luminescence peut disparaître. L'une des causes d'augmentation de la pression du gaz dans le tube à décharge est l'échauffement qui se produit lors de l'excitation par la haute fréquence. La pression du gaz dans le tube à décharge peut s'abaisser par absorption du gaz sur les parois du verre, ou sur les catalyseurs de libération de l'azote gazeux

se trouvant dans le tube. A ce moment-là l'intensité de l'émission diminue et la luminescence peut disparaître. Une variation de pression à l'intérieur du tube à décharge peut s'installer cependant graduellement lors de l'excitation. L'intensité des bandes des deux isotopes sont alors naturellement influencées de manière identique et les rapports isotopiques n'en sont pas affectés. La figure 10 donne un exemple de la baisse d'intensité graduelle de la luminescence d'un échantillon gazeux d'azote. Lorsque l'enregistrement présente une diminution graduelle de l'intensité du spectre, la mesure de la hauteur des pics s'effectue par une moyenne graphique, comme indiqué dans la figure 10 pour les valeurs a et b. Cependant, la baisse graduelle d'intensité ne doit pas être trop rapide. En effet, l'enregistrement d'un spectre d'azote se déroule en une minute, et le pic de l'azote $^{14,15}\text{N}$ est ainsi proportionnellement toujours plus petit que celui de l'azote $^{14}\text{N}_2$.

II.2.4. Dispositifs de vide pour la préparation des échantillons

Les tubes à décharge sont scellés sous vide, ou sous une pression déterminée de gaz rares. L'installation de vide est constituée d'une pompe primaire à diffusion d'huile Edwards ED 35, d'un piège d'azote liquide, d'une pompe à mercure secondaire refroidie à l'eau et d'un autre piège à azote liquide. L'un des quatre dispositifs particuliers de la figure 11 est connecté à la pompe à vide. Ces divers dispositifs sont utilisés en fonction des méthodes de libération de l'azote gazeux dans le tube à décharge. Le vide le long de la rampe est contrôlée par deux gauges Pirani G 6A et M6A, l'une placée avant la pompe à diffusion, l'autre proche du tube à décharge à sceller. La graisse de l'installation et de jointure du tube à décharge non rodé à la rampe est de la "High vacuum grease , Dow Corning Corporation, Miland, Michigan, USA".

Le dispositif de Faust pour la méthode de Dumas (élément α de la figure 11) est constitué d'un élément qui s'adapte au tube à décharge, et à un capuchon-réservoir. Le tout pivote autour de l'axe d'embouchure de l'installation à vide.

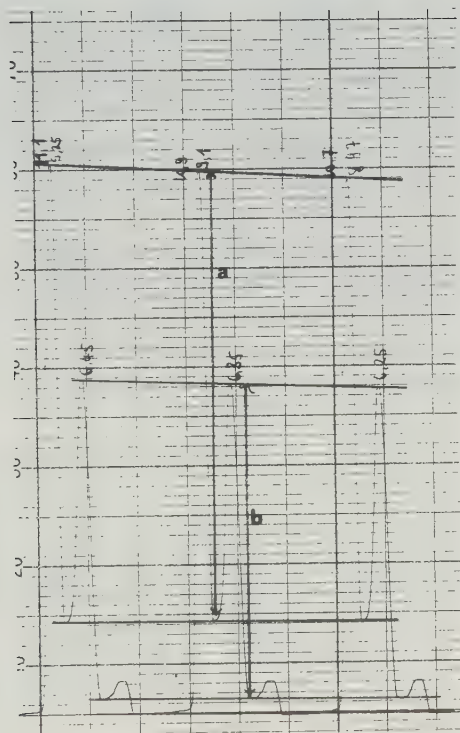
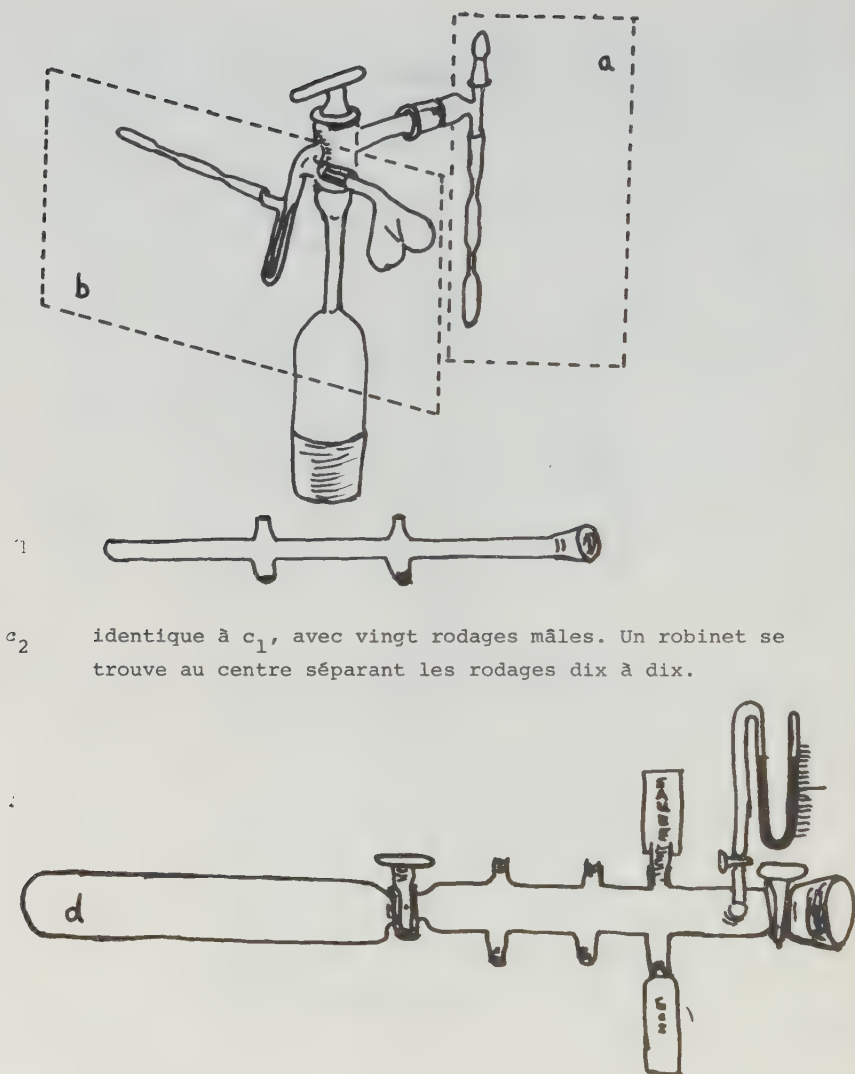


Figure 10

Spectre d'azote présentant une diminution graduelle d'intensité
au cours de son enregistrement



c₂ identique à c₁, avec vingt rodages mâles. Un robinet se trouve au centre séparant les rodages dix à dix.

Figure 11

Dispositifs particuliers de vide.

a) dispositif de Faust pour la méthode de Dumas.

b) dispositif de Faust pour la méthode à NaOBr

c) dispositif pour la méthode de Dumas modifiée

d) dispositif pour la méthode de Dumas modifiée usage de gaz rares.

Le dispositif de Faust pour la méthode de NaOBr (élément *b* de la figure 11) est constitué d'un doigt qui plonge dans de l'azote liquide et fonctionne comme piège. A sa partie supérieure s'abouchent le tube à décharge et un réservoir à deux ampoules. Ce dernier pivote sur son axe d'embouchure.

Le dispositif pour la méthode de Dumas modifiée (élément *c* de la figure 11) est constitué d'un simple tube σ_1 à quatre embouchures pour sceller simultanément quatre tubes à décharge. Une variante σ_2 permet la fermeture simultanée de dix ou vingt tubes à décharge.

Le dispositif pour la méthode de Dumas modifiée avec gaz rares (élément *d* de la figure 11) est constitué d'un segment avec robinet, comportant un manomètre à mercure pour mesurer des pressions différentielles de l'ordre du mm Hg, une tête de gauge Pirani, une admission pour les gaz rares, enfin quatre rodages mâles pour l'insertion de tubes à décharge; un autre segment constitue un réservoir avec robinet. Le volume du réservoir et le volume du segment des tubes à décharge, y compris le volume de tubes, sont égaux.

II.2.5. Transformation de l'azote des produits azotés en azote gazeux N_2

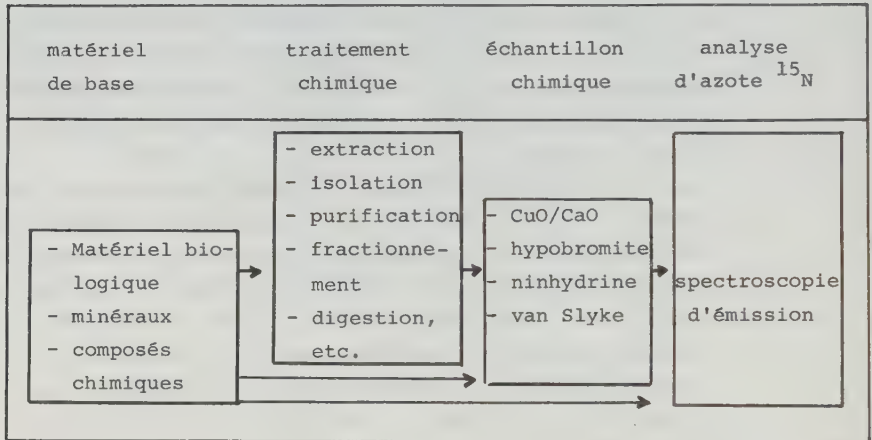
Lors d'une mesure par spectrométrie d'émission, N contenu dans les produits sous forme minérale ou organique doit être transformé en azote gazeux.

Le tableau 5 présente la procédure générale d'obtention d'azote gazeux N_2 .

Rittenberg (64), Bremner (65), Faust (63, 66) perfectionnèrent les techniques d'obtention de l'azote gazeux N_2 . Le principal problème est naturellement d'utiliser des microtechniques quantitatives et qui ne libèrent pas de substances indésirables. Pour une transformation des produits azotés, la méthode de Kjeldahl est la plus universelle. Elle permet d'obtenir un sel d'ammonium, qui peut être transformé en N_2 par les méthodes de Dumas ou à l'hypobromite. Les réactions de van Slyke et à la ninhydrine libèrent plus spécifiquement l'azote des amino-

Tableau 5

Transformation des produits azotés pour une mesure par spectrométrie d'émission



acides et des groupes α -aminés.

Le tableau 6 résume les réactions de libération de l'azote N_2 à partir de l'état de l'azote du produit.

Lors de nos travaux, nous avons utilisé quatre méthodes de libération de l'azote gazeux N_2 :

1. la méthode à l'hypobromite
2. la méthode de combustion de Dumas
3. la méthode de combustion de Dumas modifiée
4. la méthode de combustion de Dumas modifiée avec usage de gaz rares.

II.2.5.1. La méthode à l'hypobromite

La méthode de l'hypobromite s'effectue au moyen du dispositif *b* de la figure 11, après réduction de l'azote par la méthode de Kjeldahl. Il s'agit de l'oxydation d'un sel d'azote par NaOBr. L'une des ampoules de l'élément *b* contient du NaOBr,

Tableau 6
Méthodes de libération de l'azote gazeux N₂

Etat de l'azote	Méthode de libération de l'azote
azote total	combustion de Dumas
ammonium	oxydation à l'hypobromite $2 \text{NH}_3 + 3 \text{NaOBr} \longrightarrow 3 \text{NaBr} + 3 \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$
nitrites	combustion de Dumas à l'acide sulfaminique $\text{HNO}_2 + \text{NH}_2\text{SO}_4\text{H} \longrightarrow \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$
urée	à l'acide nitreux $2 \text{NHO}_2 + \text{CO}(\text{NH}_2)_2 \longrightarrow \text{CO}_2 + 3 \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$ à l'hypobromite $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + 3 \text{Br}_2 + 8 \text{NaOH} \longrightarrow \text{Na}_2\text{CO}_3 + 6 \text{H}_2\text{O} + 6 \text{NaBr} + \text{N}_2$
groupe amide	à l'acide nitreux $\text{R-CO-NH}_2 + \text{HNO}_2 \longrightarrow \text{R-COOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$
groupe aminé	à l'acide nitreux $\text{R-NH}_2 + \text{HNO}_2 \longrightarrow \text{R-OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$
oxydes d'azote NO, NO ₂ , N ₂ O	combustion de Dumas

l'autre le sel d'ammonium dissous dans 1 ml d'eau. Une fois obtenu un vide d'environ 10^{-3} à 10^{-4} mm Hg, on isole le tube à décharge du système de pompage, après avoir préalablement éliminé les gaz résiduels des solutions de NaOBr et $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ et chauffé à température élevée le tube à décharge pour le purger. En mélangeant sous vide le contenu des deux ampoules, l'azote est libéré selon la réaction suivante :



La vapeur d'eau est condensée par de l'azote liquide dans le doigt de l'élément *b*. Le tube à décharge est alors scellé au moyen d'un chalumeau.

Cette méthode a été développée par Faust qui en a généralisé le procédé pour la spectrométrie d'émission. Il semblerait cependant qu'elle ne donne pas de résultats satisfaisants avec certains composés hétérocycliques (63).

Pour avoir une luminescence optimale lors de l'émission, la pression de l'azote du tube à décharge doit être de 2,5 à 4,5 torr. Pour obtenir cette marge de pression, nous calculons la quantité de sel d'ammonium nécessaire pour libérer une quantité précise d'azote gazeux, compte tenu du volume du dispositif. Notre dispositif exige environ 40 μg d'azote. Fiedler et et Proschk (67) effectuaient la réaction à l'hypobromite dans un réservoir et transvasaient ensuite l'azote gazeux dans le tube à décharge muni à proximité d'un manomètre contrôlant la pression.

La préparation de l'hypobromite de sodium

La solution d'hypobromite de Na est préparée selon Rittenberg (64). 200 g. de NaOH en pastilles (Merck, très pur) sont dissous avec agitation dans 300 ml. H_2O et refroidis dans la glace. La solution est partagée en deux volumes égaux. Dans l'un des volumes on laisse tomber goutte à goutte durant 10 minutes 60 ml de Br_2 (Brome pour analyse Merck). Ensuite on mélange la solution restante.

Lors de son usage, la solution d'hypobromite préparée ci-des-

sus doit être diluée 1:1 avec de l'eau distillée.

La solution d'hypobromite de sodium est conservée au frigo, pour éviter les réactions d'oxydation. Elle doit aussi être utilisée fraîche, car une solution altérée ne donne plus des résultats quantitatifs. Cependant, il semble impossible d'obtenir des solutions parfaitement stables, la stabilité étant régie par un grand nombre de facteurs, tels la concentration en hypobromite et en hydroxyde, la lumière, la température et la présence de substances étrangères. Une variante de préparation de NaOBr, qui offre une meilleure stabilité, est d'ajouter NaJ à la solution (68).

II.2.5.2. La méthode de Dumas

Faust (66) utilise le dispositif *a* de la figure 11. Les catalyseurs de la réaction, CuO et CaO finement mélangés en proportion stoechiométrique 1:1 et ajoutés au produit azoté, sont placés dans un capillaire de verre de 3 mm de diamètre et de 1 cm de long. Ce dernier est introduit dans le réservoir du capuchon faisant face au tube à décharge. Le réservoir et le tube à décharge sont placés horizontalement. Après avoir obtenu un vide poussé dans le dispositifs, on chauffe au jaune le tube à décharge pour désorber les gaz de ses parois. Puis on tourne le dispositif de 90°, verticalement, logeant de cette manière le capillaire de verre contenant les catalyseurs et le produit azoté dans le tube à décharge. On scelle ce dernier au chalumeau et on le met à la cuisson dans un four à 540°C durant 6 heures. L'oxyde de Cu permet l'oxydation de l'azote en azote moléculaire et ensuite le Cu réduit l'azote de nitrates éventuellement formés lors de l'oxydation précédente; le CaO absorbe H₂O, CO, CO₂, HCl, SO₃, SO₂.

Cette méthode diminue la quantité d'azote nécessaire pour avoir une pression du gaz libéré de 2,5 à 4,5 torr dans le tube à décharge. 5 à 10 µg d'azote suffisent.

En comparaison avec la méthode à l'hypobromite, elle nécessite six fois moins d'azote.

II.2.5.3. La méthode de Dumas modifiée

La méthode de Dumas permet donc de libérer sous forme gazeuse N_2 l'azote des molécules, par chauffage des échantillons scellés sous vide en présence de catalyseurs comme CuO et CaO . En réalité, elle comporte de nombreuses variantes, quant à la température de cuisson des échantillons, aux catalyseurs, au mode d'introduction de l'échantillon azoté, etc.

Perschke et Proksh (69) utilisent une tablette de $CaO : CuO$ en proportion 1:1 de $1,5 \times 1,5 \times 5,5$ mm. Afin de pouvoir la placer dans le tube à décharge au moyen d'un aimant, ils y ajoutent 20 % de Fe_3O_4 . Préalablement, le CaO de la tablette est chauffé sous vide à $900^\circ C$ pour éliminer des interférences possibles dues à SO_2 , CO_2 , HCl etc. Sans ce traitement, le CaO ne serait pas capable d'absorber quantitativement les impuretés de la réaction.

Desaty (70) chauffe l'oxyde de cuivre, le refroidit et le stocke sous CO_2 . Il le transfère ensuite dans le tube à décharge en l'absence d'air. La réaction de libération de l'azote gazeux de l'échantillon est réalisée à $950^\circ C$. Une réaction entre CuO et le quartz du tube est possible, car la température de l'eutectique $SiO_2 - Cu_2O$ est de $1060^\circ C$, ce qui peut se produire en un point chaud non détecté.

Middelboe (61) dégaze le tube à décharge en quartz à $900^\circ C$, puis le place au four à $800^\circ C$ pendant une heure. Le seul catalyseur de la réaction est CuO . Pour capter les gaz non désirés de la réaction, il les refroidit par de l'azote liquide à l'une des extrémités du tube et il scelle celle-ci. L'autre extrémité du tube, contenant l'échantillon de N_2 avec le minimum d'impureté constitue le tube à décharge.

Toutes ces variantes de la méthode de Dumas ont été employées pour obtenir N_2 et déterminer son abondance isotopique. Si l'azote de l'échantillon n'est pas entièrement transformé en gaz, la mesure de l'abondance isotopique est cependant parfaitement exacte. Lorsqu'on veut, par contre, effectuer des dosages d'azote par une dilution isotopique, la transformation du produit azoté en azote gazeux doit être quantitative.

Fiedler et Proksch (67) expérimentèrent sur des échantillons botaniques, plantes vertes ou graines, diverses compositions

de catalyseurs. Leur but était d'obtenir une combustion complète des matériaux organiques, d'en libérer l'azote à 100 % et de réduire les impuretés gazeuses à des quantités négligeables. Le tableau 7 donne les conditions et les résultats des trois meilleurs essais de Fiedler et Proksch. Les catalyseurs sont du Cuprox (oxyde de Cu avec platine sur de l'alumine), du BDH (oxyde de Cu en granulé de 30-80 mesh BS), du perchlorate de potassium. Le platine catalyse la combustion complète du méthane formé au cours de la réaction, et le perchlorate favorise l'oxydation du matériau d'analyse.

Tableau 7

Différentes formes d'oxyde de Cu et d'oxydant additionnel pour la combustion de Dumas selon Fiedler et Proksch.

nombre d'échantillons par essais 3-5; température de combustion 570 °C; 1,5g de CaO granulé par échant.			matériau organique 150 µg par éch.			
			plante verte		graines	
forme de CuO	réactifs addition.	Durée de cuisson	% N retr.	% impur. CH ₄ , O ₂	% N retr.	% impur. CH ₄ , O ₂
1,6 g granulé	0,05g KClO ₄	3h	100	6,5	95	7
1,6 g Cuprox	" "	6h	100	0,5	97	0,5
1,6 g BDH	" "	12-15h	100	0,5	100	0,5

Il semblerait qu'une agitation constante de l'échantillon durant la combustion améliore la pureté de l'azote dégagé.

Sur la base des résultats de Fiedler et Proksch, nous avons effectué de nombreux essais dont nous parlerons dans la partie expérimentale de ce travail.

Après de nombreux essais de mélanges de catalyseurs, nous avons finalement mis au point la formule présentée dans le tableau 8.

C'est une technique de Dumas modifiée où la substance contenant l'azote à analyser est recouverte par des couches superposées de réactifs.

Tableau 8

Réactifs de combustion de la méthode de Dumas modifiée

- | | |
|----|---|
| 1. | 20 mg de CuO/CaO en poudre M/M |
| 2. | 50 mg de CuO en bâtonnets (3-5 bâtonnets) |
| 3. | 25 mg de CaO en poudre |
| 4. | 8 mg de CuO/CaO en poudre M/M |
| 5. | 5 mg de CaO en granulé |
| 6. | 7 mg de Cu en plaquettes de 1 mm^2 et 0,05 mm épaisseur |

Tous les réactifs sont des produits Merck pro anal. ou purum. La structure poudre, bâtonnets, poudre, granulés permet d'abord un contact étroit substance à analyser-réactifs, puis une meilleure circulation des gaz de combustion entre les différentes couches de catalyseurs. La présence de Cu métallique s'est imposée parce qu'il semble que la réduction de CuO de l'échantillon ne fournit pas suffisamment de Cu pour une réduction ultérieure de certains gaz de combustion tels NO_2 , N_2O_3 etc.

Manipulation

La substance azotée contenant 10-15 ug d'azote est placée au fond du tube à décharge, et recouverte par les couches successives de catalyseurs. Un ou plusieurs tubes à décharge sont alors placés sur le dispositif c_1 ou c_2 (voir figure 11) de la rampe à vide, et placés durant 3-10 minutes sous un vide de 10^{-3} à 10^{-4} torr. Le verre des tubes à décharge est chauffé au jaune, excepté l'endroit ponctuel où se trouve la substance azotée. Puis on scelle successivement les tubes à décharge. Cette technique permet de sceller vingt tubes à décharge sur la même rampe. Ceux-ci sont mis au four à $540-560^\circ\text{C}$ durant cinq heures. Pour une simple détermination d'abondance isotopique

de l'azote, sans dosage quantitatif, 1h $\frac{1}{2}$ de cuisson suffisent. Après refroidissement, les tubes sont placés dans le champ HF de l'analyseur d'azote 15. La luminescence est immédiate pour tous les échantillons; sa durée et sa répétition sont illimitées.

II.2.5.4. La méthode de Dumas modifiée avec usage de gaz rares.

Des auteurs (71) utilisent vers les années 1930-1940 des gaz rares pour soutenir la décharge dans les tubes de Geissler. Cook (72), Goleb et Middelboe (73) montrent que la luminescence d'une quantité d'azote inférieure à 1 μ g peut être amplifiée par la présence de gaz rares dans le tube à décharge. Il est prouvé que l'azote, quand il est excité dans un tube en quartz, est absorbé sur les parois. Ce problème est sans importance si l'on utilise des quantités supérieures à 10 μ g d'azote pour une analyse. Cependant, avec des quantités d'azote de l'ordre du μ g ou inférieures, l'absorption par les parois du tube est un handicap sérieux qui limite la durée de la luminescence à deux minutes au plus; la mesure n'est plus répétitive. Des essais montrèrent que tous les gaz rares soutiennent la décharge de l'azote. Le gaz le plus lourd soutient la décharge d'azote durant une période plus longue avec une intensité des pics d'émission faible, tandis que le gaz le plus léger soutient la décharge d'azote durant une période plus courte avec une intensité des pics d'émission forte. En fait, le xénon est absorbé plus fortement par le quartz que les autres gaz et retarde l'absorption de l'azote, ce qui augmente la durée de vie de la luminescence; mais comme son potentiel d'ionisation est plus bas que celui de la molécule d'azote, l'azote est faiblement excité. L'hélium est peu absorbé par le quartz, et c'est pourquoi l'azote est, lui, rapidement absorbé et la durée de vie de la luminescence d'émission courte; mais bien que son potentiel d'ionisation soit plus haut que celui de la molécule d'azote, l'azote est fortement excité.

En conclusion, le xénon empêche l'absorption rapide de l'azote sur les parois du tube à décharge, et l'hélium amplifie l'intensité de la luminescence de ce même azote. Les meilleurs

résultats de Goleb et Middelboe furent obtenus avec une pression de 0,1-0,2 torr de xénon et 10 torr d'hélium. La quantité minimale d'azote était de 0,2 μg et la durée maximale de la luminescence d'environ 10 minutes.

Nous avons effectué un certain nombre d'essais avec des gaz rares. La méthode la plus efficace pour optimiser la luminescence d'azote est celle de Dumas modifiée avec usage de 0,2 à 2 torr de xénon et de 10 torr d'hélium.

Manipulation

La substance azotée comprenant 0,8 à 5 μg d'azote est placée au fond du tube à décharge, et recouverte par les couches successives de catalyseurs. La quantité de ces derniers peut être adaptée proportionnellement à la quantité de substance azotée. Un ou au maximum quatre tubes à décharge sont alors placés sur le dispositif *d* (voir figure 11) de la rampe à vide, et purgés durant 10 minutes sous un vide de 10^{-3} à 10^{-4} torr. Le verre des tubes à décharge et du dispositif *d* sont chauffés au jaune, excepté l'endroit ponctuel où se trouve la substance azotée. Durant ces opérations les robinets 1 et 2 du dispositif *d* sont ouverts vers la rampe à vide. L'étape suivante consiste à fermer le robinet no 1 du dispositif et à introduire dans le dispositif et les tubes à décharge du xénon à l'aide d'un cylindre amovible. La pression de xénon doit être légèrement inférieure à la pression extérieure. Durant cinq minutes, on laisse s'effectuer les échanges gazeux entre les éléments résiduels des parois de verre et le xénon. Puis l'ensemble du dispositif est branché sur le vide jusqu'à une pression de 10^{-3} à 10^{-4} torr. Le robinet no 1 est à nouveau fermé et l'on introduit environ 0,5 mm Hg de xénon mesurés par un manomètre à mercure. Le robinet no 2 est alors fermé. La partie du dispositif comprenant les tubes à décharge est à nouveau mise sous vide de 10^{-3} à 10^{-4} torr. Le cylindre de gaz xénon est remplacé par un cylindre à l'hélium. Le robinet no 1 à nouveau fermé, on introduit 20 mm Hg d'hélium. La partie du dispositif *d* comportant le réservoir est égale en volume à la partie comportant les tubes à décharge, y compris le volume de ces der-

niers. Ainsi en ouvrant le robinet no 2, on obtient l'équilibre des deux gaz aux pressions partielles de 0,25 torr de xénon et 10 torr d'hélium. Les tubes à décharge sont alors scellés au chalumeau. La suite de la procédure est la même que pour la méthode de Dumas modifiée.

II.2.5.5. Caractéristiques des méthodes de libération de N₂

Les méthodes décrites libèrent l'azote gazeux des substances azotées avec une quantité négligeable d'impuretés.

Elles se différencient par la quantité minimale d'azote nécessaire pour l'analyse isotopique.

Ce point est important dans l'étude du métabolisme des médicaments où la quantité de produit isolé est souvent très faible. Le tableau 9 résume les caractéristiques des méthodes de libération de N₂.

Tableau 9
Caractéristiques des méthodes de libération de N₂

méthodes	µg d'azote par anal.	% échant. luminescents	impuretés	émissions répétitives
à NaOBr	40	100	négl.	2 ans ou plus
de Dumas	10-15	30	non négl.	qques mois
de Dumas modifiée	10-15	100	négl.	2 ans ou plus
de Dumas mod. avec gaz rares	0,8-5	100	négl.	qques semaines

II.3. Essais et mises au point de techniques analytiques

II.3.1. Mesures préliminaires d'abondance d'azote ^{15}N et amplification spécifique des pics ^{14}N , ^{14}N et ^{14}N , ^{15}N

Les essais préliminaires des mesures d'abondance isotopique de ^{15}N ont été conduits à l'aide d'échantillons standards de deux sortes :

1. des tubes à décharge, type Everton, dont l'abondance isotopique du gaz a été contrôlée par spectrométrie de masse. Ils sont fournis par Veb Berlin Chemie. Leur abondance isotopique est de 10,9, 11,9 et 25,6 % de ^{15}N respectivement.
 2. des échantillons standards de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, également contrôlés par spectrométrie de masse et fournis par Veb Berlin Chemie.
- Nous disposons des abondances isotopiques suivantes (Tableau 10)

Tableau 10
 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ standard

0,366 %	10,9 %
0,718 %	17,7 %
1,36 %	25,45 %
4,15 %	36,05 %
7,01 %	49,25 %
9,45 %	

Pour effectuer les essais préliminaires, les sels de NH_4Cl aux abondances isotopiques de 0,366 %, 0,718 %, 1,36 % et 4,15 % ont été dissous dans l'eau, à la concentration de 4 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$. L'azote a été libéré par la méthode à l'hypobromite.

La tension du photomultiplicateur pour les essais préliminaires était de 1150 à 1300 V, et les amplifications spécifiques de 30 à 3000 fois. Il s'agissait de valeurs de "tâtonnement". Les résultats des mesures ont montré des écarts importants entre l'abondance théorique et celle mesurée, comme on le constate sur le tableau 11. L'examen des spectres a permis les observations suivantes :

Tableau 11
Résultats de tests préliminaires de mesures d' ^{15}N

$\% \text{ } ^{15}\text{N}$ théorique	$\% \text{ } ^{15}\text{N}$ trouvé
Non enrichi, ^{15}N naturel	0,406 0,43
0,366	0,48 0,40
0,718	0,74 0,78
1,36	1,29 1,46 1,46 1,44 1,32 1,5
4,15	4,25 4,31
10,9 %	11,03 11,2 11,25

1. Les résultats des mesures de plusieurs échantillons d'une abondance isotopique identique en azote présentaient des écarts assez grands entre la valeur théorique et la valeur mesurée de l'azote 15.
2. Si un spectre était enregistré plusieurs fois, et qu'à chaque enregistrement le facteur d'amplification de chacun des pics était modifié, la valeur de l'abondance isotopique divergeait jusqu'à 20 % d'erreur relative.

Nous avons considéré que la pression du gaz des tubes à décharge se situait entre 2 et 7 torr. En effet, la quantité d'azote théoriquement libérée et l'intensité de la luminescence le confirmaient.

Nos enregistrements variaient donc en fonction :

1. de la tension du photomultiplicateur
2. de l'amplification spécifique des pics du spectre de l'azote
3. d'une dérive éventuelle de l'enregistrement.

Considérant le rôle de la tension du photomultiplicateur comme négligeable, car elle est égale pour chacun des pics du spectre de l'azote, et considérant au départ, la dérive de l'enregistrement comme nulle, nous avons cherché, sur la base de l'enregistrement graphique les conditions de l'amplification spécifique des pics du spectre.

Dans ce but, nous avons effectué une série de mesures. Les conditions et les résultats sont donnés dans le tableau 12. Pour certains échantillons, l'amplification spécifique des pics du spectre n'a pas été modifiée. En effet, l'enregistrement était d'une part graphiquement satisfaisant et d'autre part s'il était modifié par les amplificateurs des pics, ceux-ci devenaient soit trop grands soit trop petits.

Un examen du tableau 12 montre que :

1. la précision des mesures d'abondance isotopique est de l'ordre de 2 % pour des échantillons qui ont une abondance isotopique supérieure à 5 % de ^{15}N .
2. la précision des mesures est de l'ordre de ± 10 %, et jusqu'à 15-20 % pour des échantillons qui ont une abondance isotopique inférieure à 0,7 % de ^{15}N .
3. les variations du résultat d'un même échantillon en fonction

Tableau 12

Résultats des tests préliminaires de mesure d'azote 15 avec amplification spécifique des pics du spectre.

% ^{15}N théorique	Nombre d'enregis- trements	Amplifica- tion du pic ^{14}N (x fois)	Amplifica- tion du pic ^{15}N (x fois)	Tension du potenti- mètre	% ^{15}N trouvé	Ecart standard	% erreur relative
Non enrichi ^{15}N naturel	13	30	1000	1300	0,406	0,085	20,93
	11	100	3000	1150	0,43	0,068	15,81
0,386	3	100	3000	1350	0,48	0,057	11,87
	7	100	3000	1150	0,40	0,0057	1,56
0,718	13	100	3000	1150	0,74	0,096	12,97
	14	100	3000	1200	0,78	0,011	1,43
1,36	10	300	3000	1180	1,29	0,032	2,48
	4	100	3000	1120	1,46	0,04	2,73
	15	100	3000	1200	1,46	0,013	0,881
	6	100	3000	1250	1,44	0,018	1,25
	9	100	1000	1280	1,32	0,029	2,19
	4	30	1000	1350	1,5	0,017	1,13
4,150	12	30	300	1250	4,25	0,019	0,461
	21	30	300	1300	4,30	0,037	0,859
10,9 %	3	100	300	1250	11,03	0,105	0,95
	5	100	300	1300	11,2	0,241	2,15
	15	100	300	1300	11,25	0,064	0,57

de la tension du photomultiplicateur montrent qu'en première approximation, une tension de 1250 V fournit des résultats plus concordants entre la valeur théorique d'un échantillon et celle mesurée.

L'examen de l'enregistrement des spectres a montré que :

1. une ligne de base précise et constante est nécessaire pour l'obtention de mesures acceptables.
2. l'amplification spécifique des pics du spectre de l'azote est conditionné par une différence minimale de l'amplification des pics entre-eux, combinée avec une hauteur maximale de chacun d'eux. Cependant, la différence minimale de l'amplification des pics entre eux est le point le plus important.
3. Plus les enregistrements successifs d'un même spectre sont constants (en hauteur, ligne de base etc.), meilleur est le résultat de la mesure.

II.3.2. Différents types de spectres de l'azote

L'enregistrement de la tête de bande de la transition électronique de vibration 2-0 du deuxième système positif de l'azote présente trois pics, le pic $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ à 297,7 nm, le pic $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ à 298,3 nm et le pic $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ à 298,9 nm. La différence de nm entre les pics $^{14}\text{N}_2$ et $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ est de 0,6 nm, celle entre les pics $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ et $^{15}\text{N}_2$ est également de 0,6 nm. La hauteur d'un pic est proportionnelle à son abondance isotopique.

Les figures 12, 13, 14, 15, 16 montrent les cinq types de spectre d'émission de l'azote que nous avons recensés. Chaque type de spectre correspond à une fourchette de l'abondance isotopique de l'azote.

Lors des mesures par le spectromètre d'émission, la tension du photomultiplicateur était de 1280 V. La fente d'entrée du monochromateur de 0,04 mm. Les amplifications spécifiques des pics sont indiqués sur les enregistrements.

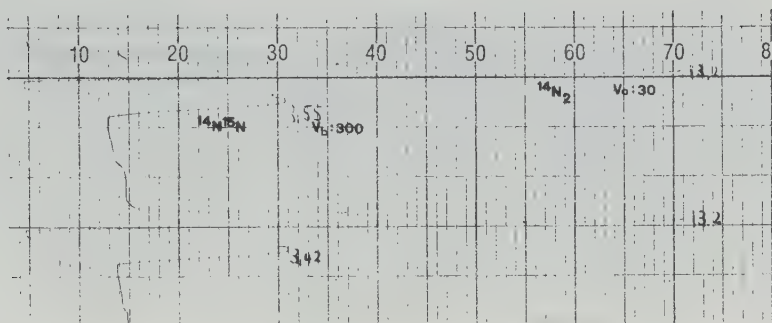


Figure 12
Type I du spectre de l'azote. 1,36 % de ^{15}N

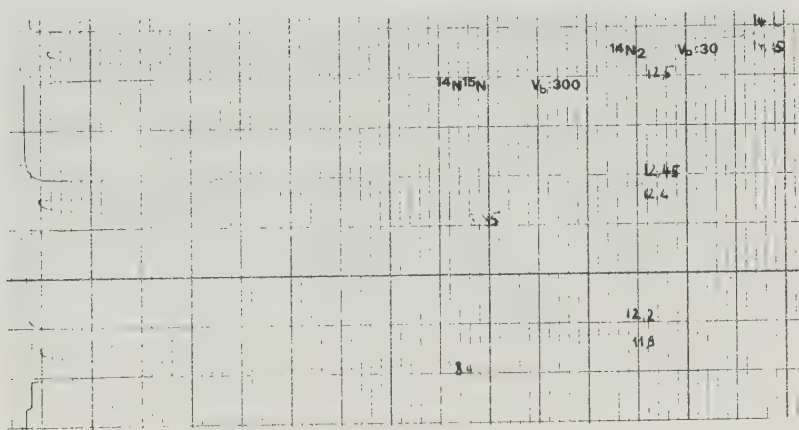


Figure 13
Type II du spectre de l'azote. 10,5 % de ^{15}N .

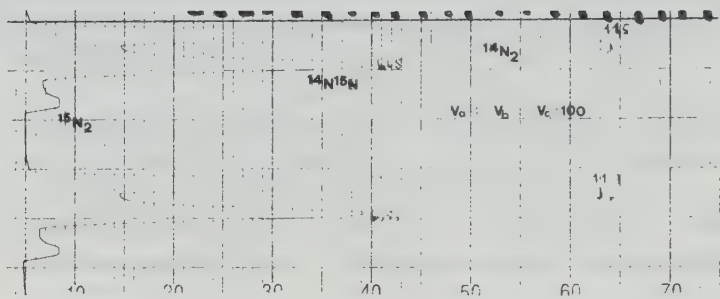


Figure 14
Type III du spectre de l'azote. 25,45 % de ^{15}N

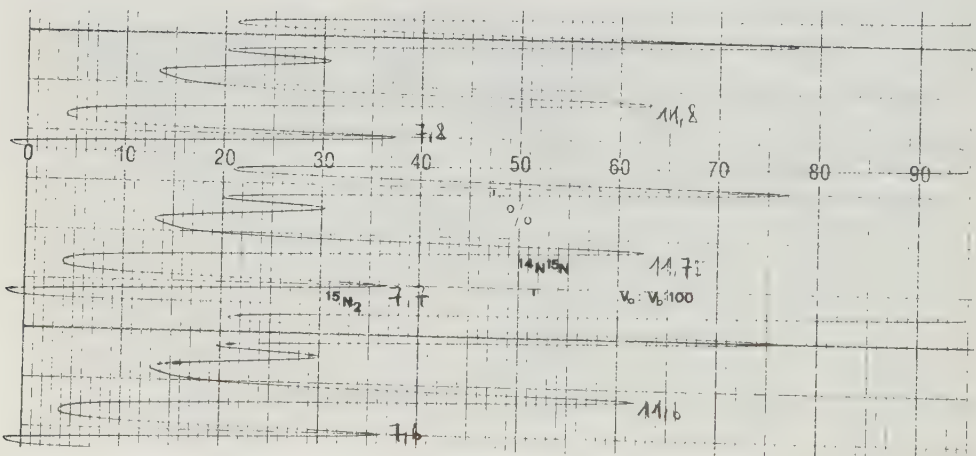


Figure 15
Type IV du spectre de l'azote. 56,6 % de ^{15}N

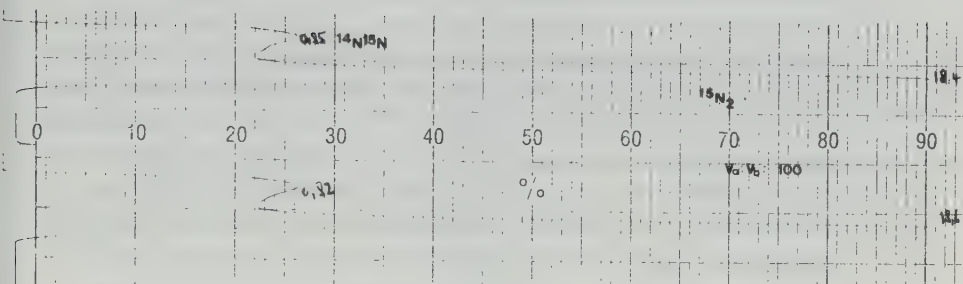


Figure 16

Type V du spectre de l'azote. 99 % de ^{15}N

Théoriquement donc, un spectre possède trois pics et une ligne de base homogène. En réalité, nos enregistrements préliminaires ont montré qu'en fonction de l'abondance isotopique un quatrième pic apparaît. En fonction de la technique d'amplification utilisée, une partie de la hauteur du pic $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ (Figure 12) se situe en dessous de la ligne de base.

Le type I du spectre de l'azote est caractérisé par un pic $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ fortement amplifié par rapport au pic $^{14}\text{N}_2$ (selon les critères d'enregistrement optimum du paragraphe II.3.1.).

Le point d'inflexion entre les pics $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ et $^{14}\text{N}_2$ est situé profondément au-dessous de la ligne de base. Le pic de $^{15}\text{N}_2$ n'est pas détectable. Ce type de spectre correspond à des abondances isotopiques de 0,366 % à 10 % d'azote ^{15}N .

Le type II du spectre de l'azote a une ligne de base homogène. Le point d'inflexion entre les pics $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ et $^{14}\text{N}_2$ est situé au niveau ou au-dessus de la ligne de base. Le pic très peu prononcé de $^{15}\text{N}_2$ peut être présent. Ce type de spectre correspond à des abondances isotopiques de 10 % à 17 % d'azote ^{15}N .

Le type III du spectre de l'azote a une ligne de base homogène. Les trois pics de l'azote sont présents, et leur hauteur est croissante dans l'ordre $^{15}\text{N}_2$, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$, $^{14}\text{N}_2$. Le point d'inflexion entre les pics $^{15}\text{N}_2$ et $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ est situé au niveau ou légèrement en-dessus de la ligne de base; celui entre les pics $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ et

$^{14}\text{N}_2$ est situé très au-dessus de la ligne de base. Ce type correspond à des abondances isotopiques de 17 % à 50 % d'azote 15.

Le type IV du spectre de l'azote a une ligne de base homogène et un background. Les trois pics de l'azote sont présents, mais on constate un dédoublement du pic $^{14}\text{N}_2$, qui forme un quatrième pic du spectre. La hauteur de ce quatrième pic croît proportionnellement avec l'augmentation de l'abondance isotopique de l'azote 15. Ce type de spectre correspond à des abondances isotopiques de 50 % à 80 % d'azote 15.

Le type V du spectre de l'azote est caractérisé par les pics $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ et $^{15}\text{N}_2$ fortement et identiquement amplifiés. Le pic $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ est très petit par rapport au pic $^{15}\text{N}_2$. En général, le pic dédoublé de $^{14}\text{N}_2$ n'apparaît pas, car on ne l'amplifie pas, la valeur de sa hauteur n'étant pas nécessaire pour le calcul de l'abondance isotopique. Ce type de spectre correspond à des abondances isotopiques de 80 à 100 %.

II.3.3. La mesure de la hauteur des pics du spectre de l'azote

La hauteur des pics du spectre de l'azote intervient dans la formule du calcul de l'abondance isotopique. On peut envisager plusieurs manières de mesurer la hauteur des pics. Par exemple, on peut mesurer la hauteur des pics à partir d'une ligne de base identique pour tous, ou considérer que chaque pic possède une base individuelle. Ce problème est important, car il peut se résoudre par une méthode directe de mesure de l'abondance isotopique ou au contraire, nécessiter un facteur de correction pour un ou plusieurs pics.

Les études faites au sujet de la mesure de la hauteur des pics concernent, en général, des échantillons de faible abondance isotopique, où souvent la présence d'impuretés (du fait du mode de libération de l'azote gazeux) pouvait influencer la ligne de base.

Leickman et coll. (62) mesuraient la hauteur des pics à partir de leur ligne de base respective (Figure 17) et appliquaient ensuite un facteur de correction quasi constant pour un domaine

d'abondance isotopique.

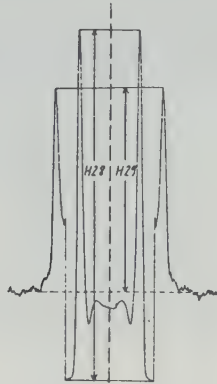


Figure 17

Mesure de la hauteur des pics de l'azote avec une courbe de correction. Selon Leickmann.

Faust utilisait une procédure similaire en établissant une courbe de calibration de la hauteur des pics à l'aide des valeurs obtenues par spectrométrie de masse. Perschke et Proksch (69) procédaient à une simple interpolation linéaire de la ligne de base du pic de ^{14}N , ^{15}N , comme le montre la figure 18.

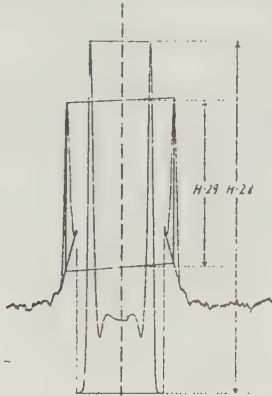


Figure 18

Mesure de la hauteur des pics de l'azote par correction graphique. Selon Perschke et Proksch.

Keeney et Tedesco (59) mesurent le pic $^{14}_{N}^{15}_{N}$ à partir de sa propre ligne de base et celui de l'azote $^{14}_{N}_2$ à partir de la ligne de base de tout le spectre. La figure 19 montre cette procédure. Ils utilisent ensuite un facteur de correction, obtenu à partir d'une courbe de calibration établie par spectrométrie de masse.

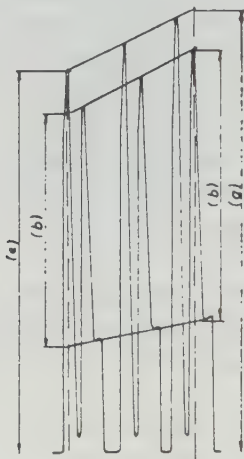


Figure 19

Mesure de la hauteur des pics de l'azote. Selon Keeney et Tedesco.

Ferraris et Proksch (57) étudièrent la mesure de la hauteur des pics du spectre de l'azote pour des abondances isotopiques de 0,366 % à 100 %. Ils recommandent les cinq procédures suivantes adaptées à des domaines précis d'abondance isotopique :

1. pour des abondances isotopiques de 0,366 à 3,8 % d'azote 15 ils préconisent la même procédure que Keeney.
2. pour des abondances isotopiques de 3,8 % à 15 % d'azote 15, ils mesurent la hauteur des pics de l'azote $^{14}_{N}_2$, $^{14}_{N}^{15}_{N}$ au-dessus du background.
3. pour des abondances isotopiques de 15 % à 50 % d'azote 15, ils mesurent la hauteur des pics de l'azote $^{14}_{N}^{15}_{N}$ et $^{15}_{N}_2$ au-dessus du background.

4. pour des abondances isotopiques de 27 % à 100 % d'azote ^{15}N , ils mesurent la hauteur du pic de l'azote $^{15}\text{N}_2$ au-dessus du background; la hauteur du pic de l'azote $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ au-dessus du background est réduite de 20 % de la hauteur du pic de l'azote $^{15}\text{N}_2$.
5. pour des abondances isotopiques de 3 % à 10 % d'azote ^{15}N , ils mesurent la hauteur du pic de l'azote $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ après interpolation linéaire graphique de la base du pic comme Perschke et Proksch, et la hauteur du pic de l'azote $^{15}\text{N}_2$ au-dessus du background. Tous les auteurs mentionnés obtiennent des résultats de mesure d'abondance isotopique avec des erreurs relatives inférieures à 3%.

II.3.3.1. Mise au point de la mesure de la hauteur des pics du spectre de l'azote

Les procédures pour choisir la hauteur des pics de l'azote varient d'un auteur à l'autre. Les photomultiplicateurs, les enregistreurs, les méthodes de libération de l'azote gazeux (impuretés résiduelles possibles) que ces auteurs utilisèrent sont également différents. Nous avons donc cherché le moyen le plus précis de mesurer la hauteur des pics de l'azote. Les conditions expérimentales sont présentées dans le tableau 13.

Nous avons étudié les procédures suivantes pour la mesure de la hauteur des pics du spectre de l'azote. Elles sont au nombre de cinq et sont présentées dans le tableau 14.

Le résultat des diverses procédures est donné dans le tableau 15. La première colonne du tableau indique l'abondance isotopique théorique de l'azote. Les colonnes suivantes donnent, pour chaque procédure le pourcentage de l'erreur relative. Cette dernière a été établie ainsi :

- l'abondance isotopique d'un échantillon a été déterminée par la moyenne de 5 à 7 enregistrements du spectre
- trois à cinq échantillons ont été mesurés pour une abondance isotopique identique
- la moyenne de la différence entre la valeur de l'abondance isotopique théorique et les valeurs mesurées des échantillons

Tableau 13

Conditions expérimentales lors de la mise au point de la mesure de la hauteur des pics du spectre de l'azote.

Standard d'azote 15	- tubes à décharge Everton Veb Berlin à 10,9 %, 11,9 % et 25,45 % d'azote 15 - sels standard Veb Berlin $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ à 0,366 %, 1,36 %, 4,15 %, 9,45 %, 10,5 %, 17,7 %, 25,45 %, 36,05 %, 49,25 % d'azote 15 - sels standards par dilution isotopique à 7,86 %, 9,63 %, 16,94 %, 21,41 %, 25,6 %, 48,38 % d'azote 15 - molécules organiques par dilution isotopique à 57,25 %, 83,26 %, 83,59 %, 91,3 %, 99 % d'azote 15.
libération de l'azote gazeux	selon la méthode de Dumas modifiée
ouverture de la fente d'entrée du monochromateur	0,4 mm
amplification spécifique des pics du spectre	selon les remarques sur les enregistrements page 45
tension de mesure de l'enregistreur	10 mV
nombre d'échantillons pour une abondance isotopique	3-5
nombre de spectres enregistrés par échantillon	5-7
tension du photomultiplicateur	1280 KV

Tableau 14

Procédures de mesure de la hauteur des pics du spectre de l'azote.

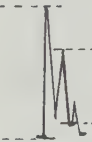
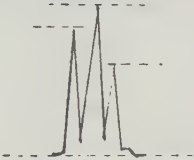
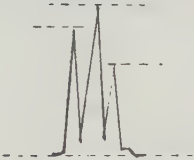
Procé- dure	hauteur des pics	schéma de l'enregistrement et de la mesure des pics	
		faible abondance isotopique	forte abondance isotopique
1	hauteur entre le ni- veau du point d'inflex- ion précédent le pic et le sommet du pic		
2	selon procédure de Keeney (voir p. 52)		
3	hauteur à partir d'une ligne de base générale du spectre		
4	hauteur à partir d'une ligne de base au niveau du point d'inflexion entre les pics $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ et $^{15}\text{N}_2$		
5	hauteur à partir d'une ligne de base au niveau du point d'inflexion entre les pics $^{14}\text{N}_2$ et $^{14,15}\text{N}$		

Tableau 15

% erreur relative des déterminations de l'abondance isotopique de l'azote en fonction des diverses procédures du choix de la hauteur des pics du spectre.

- Libération de l'azote gazeux selon la méthode de Dumas modifiée
- 3 à 5 mesures par abondance isotopique
- 5-7 spectres enregistrés par échantillon
- Tension du photomultiplicateur: 1280 V

% N ¹⁵ théorique	% er. rel. M ₁ Méthode 1	% er. rel. M ₂ Méthode 2	% er. rel. M ₃ Méthode 3	% er. rel. M ₄ Méthode 4	% er. rel. M ₅ Méthode 5
0,366	2,18	28,54	-	-	-
0,718	1,06	27,50	-	-	-
1,36	1,94	3,82	-	-	-
4,15	1,15	13,35	-	-	-
7,86	1,61	8,14	-	-	-
9,45	1,10	1,51	1,16	0,58	1,01
9,63	1,03	14,00	18,00	18,00	16,00
10,50	3,72	6,75	6,08	5,61	6,01
10,90	0,81	1,83	1,86	2,66	1,60
11,90	2,74	6,99	5,27	5,96	5,99
16,94	2,51	2,67	3,50	4,94	5,53
17,70	0,91	7,10	5,15	5,10	13,50
21,41	3,36	7,07	-	-	-
25,45	2,18	11,80	5,16	6,60	10,70
25,60	3,71	7,70	3,70	7,30	13,00
36,05	1,75	18,53	13,00	14,00	16,00
48,38	3,18	5,65	4,22	4,22	25,52
49,25	2,23	6,08	9,86	9,86	21,60
57,25	3,37	13,90	2,38	2,38	8,60
83,59	3,35	0,89	7,68	7,68	1,96
91,50	4,33	3,48	7,34	7,34	1,28
99,00	2,21	15,15	15,00	15,00	3,78

- : les procédures ne sont pas applicables

a été calculée

- l'erreur relative est calculée à partir de cette moyenne.

On constate que l'erreur relative de la procédure no 1 est la plus faible. Elle se situe entre 2 et 4 %. Les autres procédures ne sont pas suffisamment précises analytiquement. Nous utilisons donc uniquement la procédure no 1 pour la détermination isotopique de nos échantillons. Celle-ci est identique aux méthodes 3 et 4 de Ferraris, qui les considéreraient comme précises pour des mesures d'abondance isotopique entre 15 % et 100 % d'azote 15. La procédure no 1 est également précise pour des abondances isotopiques de 0,366 % à 15 % d'azote 15, car l'amplification importante du pic $^{14}_{\text{N}}$ minimise l'effet d'épaulement de ce pic.

II.3.4. La tension du photomultiplicateur

Au cours des essais préliminaires, nous avons observé que la tension du multiplicateur influençait la valeur des mesures de l'abondance isotopique de l'azote.

Nous avons cherché à déterminer la meilleure tension pour obtenir l'abondance isotopique la plus précise. Nous avons utilisé trois tubes à décharge Everton standard (Veb Berlin) contenant de l'azote à 10,9 %, 11,9 % et 25,6 % d'azote 15. Le spectre de l'azote de chacun des tubes a été enregistré à des tensions de 1000, 1200, 1300, 1400 et 1500 V. L'abondance isotopique a été calculée selon les cinq procédures du paragraphe précédent. Les figures 20 a, b, c, d, e montrent la variation de l'erreur relative en fonction de la tension du photomultiplicateur. L'erreur relative indiquée sur les figures est la moyenne de l'erreur relative des trois échantillons à la tension considérée.

Chaque figure concerne l'une des procédures de mesure de la hauteur des pics du spectre.

Nous constatons que l'erreur relative de la procédure 1 est minimale entre une tension de 1200 et 1300 V du photomultiplicateur. Nous avons alors décidé de travailler à une tension de 1280 V. Les figures des procédures 2 et 3 montrent que l'erreur relative est moindre aux tensions extrêmes. Les valeurs de l'erreur rela-

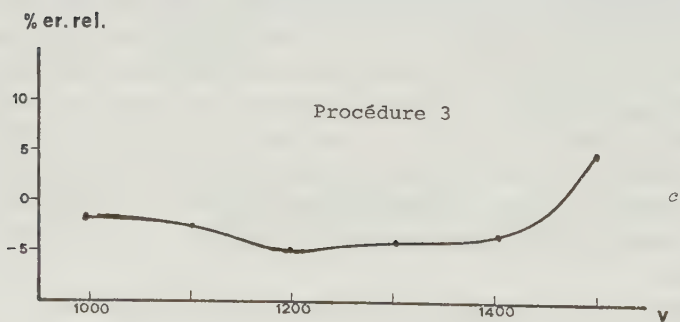
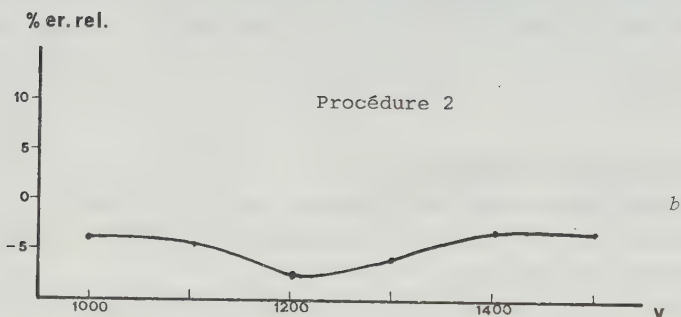
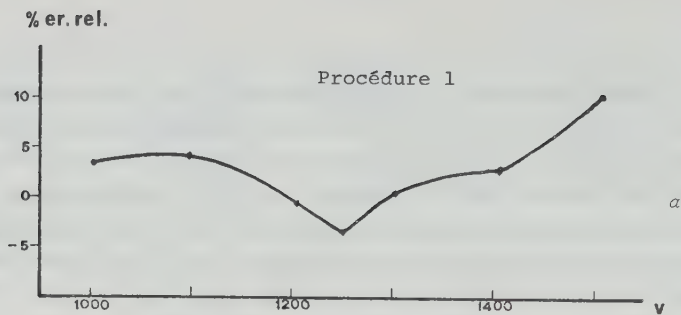


Figure 20

% erreur relative en fonction de la tension du photomultiplieateur. Procédures 1, 2, 3 de mesure de la hauteur des pics du spectre.

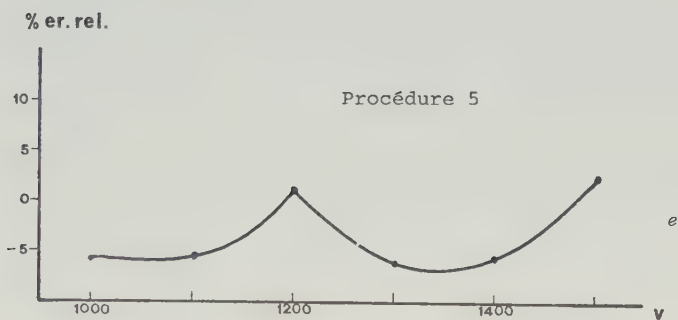
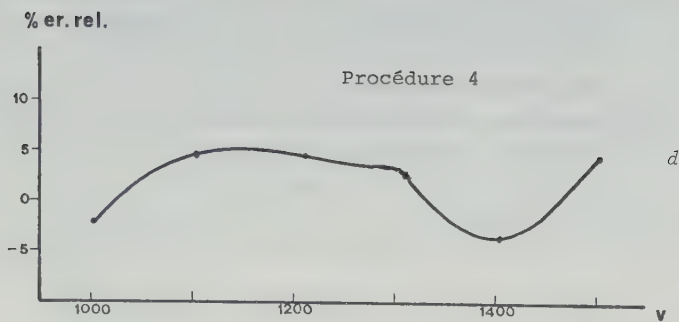


Figure 20

% erreur relative en fonction de la tension du photomultiplicateur.
Procédures 4 et 5 de mesure de la hauteur des pics du spectre

tive des procédures 4 et 5 sont, elles, très dispersées.

Le résultat des procédures 2, 3, 4, et 5 n'a pas de signification réelle, car ces procédures sont inadéquates pour la mesure de l'abondance isotopique. Cependant, nous pouvons admettre que la procédure 1 est de toute manière la plus précise entre 1200 et 1300 V, comparée aux autres.

II.3.5. Comportement du verre rasotherm des tubes à décharge en fonction de la température et de la durée de cuisson

Lors des essais préliminaires, nous avons constaté qu'à une température de l'ordre de 600°C , le verre des tubes à décharge subissait une transformation. En effet, on constatait un aplatissement du tube à la sortie du four. La température avait donc une influence sur la résistance du verre, et peut-être pas seulement la température, mais le mélange verre-poudre de catalyseur.

Cinq échantillons préparés selon la méthode de Dumas et cinq tubes témoins préparés par la méthode à NaOBr ont été placés au four à des températures et pour des durées de cuisson différentes. La stimulation haute fréquence des tubes à décharge a été faite après abandon des tubes durant 24 heures à température ambiante.

Le tableau 16 donne les résultats obtenus en fonction de la température du four et de la durée de cuisson pour des échantillons en verre rasotherm.

On constate qu'une température de 540°C durant $2\text{h}\frac{1}{2}$ semble juste suffisante pour permettre la réaction catalytique de Dumas (raison de la non luminescence des tubes préparés selon Dumas où deux échantillons ne présentent pas de luminescence). Les échantillons témoins NaOBr restent tous luminescents.

La température de 580°C modifie vraisemblablement la porosité du verre rasotherm car trois échantillons témoins NaOBr et trois de Dumas ne sont plus luminescents. Si l'on stimule les échantillons une semaine plus tard, la luminescence reste identique. Les échantillons encore luminescents remis au four à 650°C ne peuvent plus être stimulés.

II.3.6. Essais de l'efficacité des "catalyseurs de libération" de N_2

II.3.6.1. Selon la méthode de Dumas

Lors des essais de la méthode de libération de N_2 selon Dumas, nous avons étudié deux modes d'introduction de la substance :

Tableau 16

Luminescence d'échantillons en verre rasotherm en fonction de la température et de la durée de cuisson.

Conditions		Luminescence									
Temp. du four (°C)	Durée de cuisson (h)	Echantillons selon NaOBr					Echantillons selon Dumas				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
520	2½	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
540	2½	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
540	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
550	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
570	2½	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
570	5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
580	16	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Une stimulation de luminescence avec les mêmes échantillons une semaine après la stimulation initiale a donné les mêmes résultats.											
650	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : luminescent

- : non luminescent

Lors de ces expériences, nous avons également fait varier la quantité de substance de l'échantillon, la durée et la température de combustion.

L'azote était sous forme de sels $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ standards (Veb Berlin). Ces derniers furent dissous dans de l'eau distillée à une concentration de l'ordre de 4 μg d'azote/10 μl .

Introduction de la substance dans un capillaire

Le tube capillaire présente une ouverture de 0,2 mm de diamètre. Il est long de 1 à 1,5 cm.

La solution de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ est introduite dans le capillaire. Un chevalet métallique, relié à un corps de chauffe et spécialement aménagé pour recevoir les capillaires (Figure 21), permet d'évaporer le solvant :

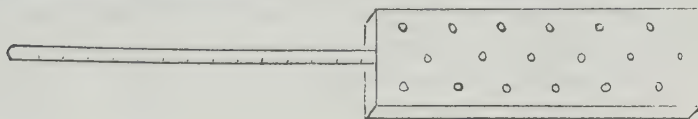


Figure 21

Chevalet chauffant pour évaporer le solvant des capillaires.

Le chevalet présente deux inconvénients :

1. si la quantité de solution à introduire dans le capillaire dépasse sa capacité, il faut répéter l'opération.
2. la solution déborde à cause de la capillarité et de la différence de température entre la base et le sommet du capillaire.

Le sel de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ est alors recouvert par 30 mg de poudre CaO-CuO M/M et le capillaire introduit dans le dispositif α de Faust (figure 11).

Le tube à décharge et l'appendice contenant le capillaire sont mis sous vide de 10^{-3} mm Hg durant 10-15 minutes. Il est chauffé au jaune. L'ensemble est tourné de 90° pour permettre au capillaire de pénétrer dans le tube. On scelle alors celui-ci

au chalumeau.

Le tableau 17 donne les caractéristiques et les résultats des essais de la méthode de Dumas avec introduction de la substance à l'aide d'un capillaire.

On constate qu'il n'y a que 10 % de tubes luminescents environ. Nous pensons que la diffusion des gaz hors du capillaire était mauvaise. Il est difficile de renverser, par agitation, la poudre à l'intérieur du tube à décharge avant sa mise au four. Il semble qu'on soit également en présence d'une certaine dilution de l'azote des échantillons due aussi à la mauvaise circulation des gaz.

Introduction directe de la substance dans le tube à décharge

La solution de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ est placée directement dans le tube à décharge et évaporée à l'étuve à 100°C . Ensuite 0,05 à 0,08 g de CuO-CaO M/M sont introduits dans le tube à décharge. Ce dernier est placé sur la rampe à vide sous 10^{-3} mm Hg durant 10-15 minutes, chauffé au jaune et scellé au chalumeau. Le tableau 18 résume les conditions et les résultats de ces essais.

On constate que 30 % des tubes sont luminescents. La dilution isotopique semble moins importante que lors des essais précédents. Certains échantillons n'ont été luminescents que 3 jours après leur sortie du four.

II.3.6.2. "Catalyseurs de libération" de N_2

Notre but, était de maîtriser une technique de préparation des échantillons, où tous les tubes à décharge soient immédiatement luminescents.

Desaty (70) avait déjà modifié la méthode de Dumas, notamment en ajoutant aux catalyseurs de combustion, du KClO_4 .

Nous avons procédé à des essais avec 0,08 g CaO-CuO M/M plus quelques cristaux de KClO_4 , afin d'activer l'oxydation de l'échantillon azoté. La température de combustion était de

Tableau 17

Conditions et résultats des essais de détermination de l'azote 15 selon la méthode de Dumas.
Introduction par capillaire de l'échantillon et des catalyseurs dans le tube à décharge.

30 mg de poudre CuO-CaO M/M

Nombre de tubes à décharge	% ¹⁵ N théorique	Quantité d'azote (μg)	Temp. du four (°C)	Durée de cuisson	Nombre échant luminescents	Moyenne ¹⁵ N mesuré %
10	10,90	10	570	3h	aucun	-
10	25,50	10	570	6h	aucun	-
10	36,05	15	550	6h	2	30,2
5	25,50	15	550	3h	aucun	-
10	11,09	15	560	6h	1	9,7
5	25,50	15	560	24h	3	22,2

Tableau 18

Conditions et résultats des essais de détermination de l'azote 15 selon la méthode de Dumas.
Introduction directe de l'échantillon et des catalyseurs dans le tube à décharge.

Nombre de tubes à décharge	% 15 N	Quantité d'azote [µg]	Qté catalyseur CuO-CaO g	Temp. du four [°C]	Durée cuisson (h)	Nombre d'échantillons luminescents	Moyenne % 15 N mesuré	Remarque
5	0,366	10	0,05	570	6	1	0,40	Luminescence
5	1,36	15	0,1	570	3	2	1,31	3 jours après sortie du four
5	25,50	15	0,1	560	6	1	23,60	
5	36,05	15	0,1	560	3	2	34,27	
5	10,90	15	0,1	540	6	2	10,10	
5	11,90	15	0,1	540	3	2	11,20	
5	17,70	15	0,1	550	3½	3	17,00	

560 °C pendant 3½ heures. La quantité initiale de KClO_4 dans les tubes à décharge était de 5 mg environ. Cette procédure provoquait une libération excessive de gaz et une déformation du tube à décharge sorti du four. Aucun échantillon ne fut luminescent.

Nous avons procédé aux mêmes essais avec un ou au maximum deux cristaux de KClO_4 (1-2 mg). Les résultats furent 50 % d'échantillons luminescents. Le tableau 19 donne les caractéristiques et les résultats de chaque échantillon luminescent.

L'utilisation de catalyseur en poudre uniquement ne permet pas une luminescence à 100 % lors de la stimulation par haute fréquence. La diffusion gazeuse est vraisemblablement insuffisante avec des produits en poudre et la combustion incomplète. Nous avons alors effectué une série d'essais, avec des mélanges de CuO en poudre et en bâtonnet, CaO en poudre et en granulé. L'échantillon était mis au four à 540 °C durant 5 heures. Le 80 % des tubes à décharge présentaient après refroidissement une luminescence immédiate.

Finalement, en ajoutant du Cu en plaquette de 1 mm² (2-3 plaquettes par tube à décharge), nous avons obtenu la luminescence de 100 % des échantillons. Le dosage précis des divers composés du catalyseur et la manipulation sont mentionnés au paragraphe II.2.5.3. L'utilisation de ce mélange de catalyseurs a été appelée pour simplifier "Méthode de Dumas modifiée".

II.3.6.3. Limites des quantités d'azote lors de l'utilisation de la méthode de Dumas modifiée

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé des quantités variables d'azote. En nous basant sur la luminescence, nous avons pu établir les limites des quantités d'azote pour obtenir une luminescence immédiate de tous les échantillons azotés minéraux ou organiques.

Le tableau 20 en donne les valeurs.

Le facteur d'amplification des pics donne une information sur l'intensité lumineuse des tubes à décharge.

Tableau 19
Méthode de Dumas avec 1 ou 2 cristaux de KClO_4 (1-2 mg)

Quantité d'azote (μg)	% ^{15}N théorique	subst.	Quantité catalyseur CaO-CuO	Luminescence	Nbre de déterminations	% ^{15}N mesuré	écart standard du nbre de mesure
10	4,15	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	0,05 g	différée	5	3,96	0,02
10	99,00	A	0,1 g	différée	11	92,45	0,07
10	99,00	A	0,1 g	immé.	15	96,78	0,07
10	99,00	A	0,1 g	"	9	94,09	0,08
10	1,36	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	0,1 g	différée	10	1,30	0,02
10	99,00	A	0,1 g	immé.	7	94,61	0,28
10	0,366	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	0,1 g	immé.	10	0,39	0,02
10	0,718	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	0,1 g	"	10	0,69	0,02
10	1,36	"	0,1 g	"	10	1,31	0,02
10	25,45	"	0,1 g	"	11	25,86	0,12
10	25,45	"	0,1 g	"	12	25,53	0,99

A : Actébral ^{15}N , subst. organique

Tableau 20
Quantité d'azote et nombre d'échantillons luminescents
lors de l'utilisation de la méthode de Dumas modifiée.

Quantité d'azote	Nombre d'échantillons	Nombre échantillons luminescents	% échant. luminescents	Facteur d'amplification des pics	
				$^{14}_N$ $^{15}_N$	$^{15}_N$
1 µg	10	-	0	-	-
2 µg	20	4	20	10.000	10.000
5 µg	40	12	30	3.000	3.000
7 µg	20	15	75	3.000	3.000
10 µg	200	200	100	1.000	1.000
15 µg	200	200	100	100	100
20 µg	200	200	100	10	10

La méthode de Dumas modifiée est donc efficace à 100 % pour la libération de quantités d'azote de l'ordre de 10 à 20 µg. La quantité de catalyseur est de 100 µg.

II.3.7. La "méthode de Dumas modifiée" avec usage de gaz rares

Lors d'études de métabolisme, il est souvent difficile d'obtenir 10 µg d'azote. En effet, si un seul atome d'azote est lié structurellement à une molécule d'une masse moléculaire d'environ 400, masse de la plupart des médicaments, c'est 300 µg environ de substance qu'il faut isoler. En milieu biologique, une telle quantité est énorme.

Aussi, pour diminuer la quantité d'azote nécessaire pour une analyse isotopique, avons-nous cherché à utiliser des gaz rares. Ceux-ci sont capables d'amplifier l'intensité et d'augmenter la durée de la luminescence.

Pour nos essais, nous avons employé le dispositif d (figure 11)

II.3.7.1. Essais de la méthode de Dumas modifiée avec usage d'hélium

Selon les premières expériences de physique des gaz rares en milieu gazeux raréfié vers 1934, un gaz rare peut soutenir la luminescence d'un autre gaz. Nous avons effectué des essais préliminaires avec de l'hélium. C'était de l'hélium en cylindre de 200 litres (Air Liquide SA) dont la pureté est de 98 %. Nous avons utilisé des sels $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ à 36,05 %, car à cette abondance les trois pics du spectre sont bien individualisés. Les quantités initiales d'azote étaient de 0,8 et 0,2 μg .

Dans une première série d'expériences, nous avons chauffé le tube au jaune avant de le sceller sous vide pour le purger de l'azote atmosphérique résiduel absorbé sur ses parois.

Certains tubes à décharge ont été purgés avec de l'hélium par remplissages et vidanges répétées sous vide. La quantité de catalyseur était de 5 mg. La pression d'He de 4 à 30 torr. Le tube à décharge a été chauffé au jaune pour quelques échantillons.

Le tableau 21 donne les conditions et les résultats des essais préliminaires de mesure isotopique de l'azote avec de l'hélium.

On constate :

1. qu'à la pression de 4 torr d'hélium, on obtient une luminescence, mais que le spectre de l'azote ne peut être enregistré.
2. que la pression optimale pour la luminescence semble se situer entre 4 et 7 torr
3. que les résultats présentent une valeur d'azote 15 inférieure à celle attendue; il y a donc dilution.
4. qu'à 20 torr, on peut obtenir une luminescence, mais qu'on observe une forte dilution, provenant peut-être du gaz rare

Tableau 21

Essais préliminaires de mesure isotopique de l'azote avec de l'hélium

Pression d'hélium (torr)	Qté azote (µg)	% 15N théorique	Lavage du tube au gaz	Chauffage du tube jaune	Conditions de mesure		% 15N mesuré	Remarques
					Tension du photomultipl. (V)	Amplifica- tion 14N, 15N, N2		
13	0,8	36,05	non	oui	1300	10000-10000	non mesurable	luminescence
16	"	"	non	oui	1280	3000-1000	non mesurable	"
13	0,8	36,05	non	oui	1280	10000-10000	"	"
7	"	"	"	oui	1280	1000-1000	22,26	-
7	0,8	"	"	oui	1280	3000-3000	29,46	luminescence violet-carm
4	0,8	"	"	oui	"	1000-1000	24,53	" "
4	tube vide	-	non	non	-	-	-	pas de luminescence
20	0,8	36,05	"	non	1280	300-300	5,82	-
"	"	"	oui	"		300-1000	6,33	
30	"	"	oui	oui	-	-	-	pas de lumines- cence
30	"	"	oui	non	"	-	-	"

pas suffisamment pur en azote.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons déterminé l'abondance isotopique des échantillons avant et après la mise au four des tubes à décharge. La quantité de catalyseur a été augmentée pour un certain nombre d'échantillons. Lors de l'expérience précédente, nous avons constaté que certains tubes présentaient durant 3 à 5 minutes une luminescence violette qui parfois devenait rose. Nous en avons conclu que des gaz résiduels de la combustion étaient mal absorbés par CaO . (Notamment H_2O qui présente à cette longueur d'onde une luminescence bleue). C'est la raison pour laquelle, dans cette deuxième série d'expériences, nous avons placé une quantité de CaO plus élevée dans un certain nombre d'échantillons. Nous avons ainsi purgé certains tubes 2 fois à l'hélium. Le tableau 22 montre les conditions et résultats de cette deuxième série d'expériences avec de l'hélium.

Les 12 premiers essais montrent que :

non purgé par le gaz rare, et sans chauffage préalable au jaune du tube à décharge, l'azote résiduel reste fixé aux parois de celui-ci. En effet, une détermination d'azote avant passage au four du tube à décharge donne le spectre et l'abondance isotopique de l'azote naturel.

La détermination de l'azote après passage au four du tube à décharge montre que la quantité de catalyseur (25 mg) est insuffisante.

Lors des 24 essais suivants, nous avons purgé deux fois le tube à décharge avec de l'hélium et nous constatons qu'avant la mise au four des tubes à décharge, la plupart d'entre eux ne sont pas luminescents.

Si la quantité de CaO est augmentée, la luminescence est plus intense et les mesures plus précises.

La combustion et l'absorption des gaz non désirés sont donc plus complètes.

Une quantité de substance de $0,2 \mu\text{g}$ d'azote est la limite inférieure pour obtenir une luminescence mesurable.

Tableau 22

Essais préliminaires de mesure isotopique d'azote avec de l'hélium

Pression d'hélium (torr)	Qté d' N (µg)	% 15 N théorique	catalyseur	lavage du tube au gaz	chauffage du tube au jaune	Conditions de mesure		% 15 N mesuré		Remarques
						Tension du photo-cathode	Amplification du pic 14, 15, 15, N, W, N	avant mise au four	après mise au four	
4	0,8	36,05	+	non	non	1250	100-100	0,37	0,64	luminescence immédiate, violet clair
4	"	"	"	"	"	"	"	0,31	7,75	3j. après passage au four la luminescence augmente
4	"	"	"	"	"	"	"	0,43	0,84	
6	0,8	"	+	non	non	1280	300-1000	non mes.	1,94	
6	"	"	"	"	"	"	3000-10000	0,54	11,09	
6	"	"	"	"	"	"	300-1000	0,49	1,18	
2	"	"	"	non	"	"	1000-3000	-	5,42	enregistrement mauvais
2	"	"	"	"	"	"	"	-	3,80	
2	"	"	"	"	"	"	"	-	6,83	
7	pas d'N	-	-	non	"	"	1000-100	0,30	-	N résiduel ou du gaz violet carmin, enregistrement déficient
7	"	"	"	"	"	"	"	0,30	0,60	
7	"	"	"	"	"	"	"	0,28	-	
4	0,8	36,05	+	2 X	non	"	300-3000	-	-	
4	"	"	+	"	non	"	300-1000	2,87	13,61	
5	"	"	"	2 X	"	"	100-1000	0,89	4,97	
5	"	"	++	"	"	"	"	0,78	4,74	
5	"	"	++	"	"	"	"	1,54	5,02	
4	"	"	+++	2 X	oui	"	1000-1000	-	23,31	disparition rapide de la luminescence
4	"	"	"	"	"	"	"	-	42,99	
4	"	"	"	"	"	"	"	-	-	
1	0,8	"	"	2 X	oui	1280	3000-3000	-	28,04	
1	"	"	+++	"	"	"	"	-	30,24	
1	"	"	"	"	"	"	"	-	-	
4	"	"	"	2 X	"	"	100-100	-	34,98	tubes à décharge 36h. au four à 520°C
4	"	"	"	"	"	"	"	-	34,86	
4	"	"	"	"	"	"	100-300	-	38,13	
2	0,8	36,05	"	2 X	non	"	"	-	-	
4	0,2	"	"	"	oui	"	3000-10000	-	-	Avant mise au four, aucun
4	0,2	"	"	"	"	"	"	-	-	tube luminescent,
3,5	"	"	"	"	oui	"	"	-	-	24 au four, 24h d'attente, luminescence le temps de quelques mesures
2	"	"	"	"	"	"	"	-	-	
1 1/2	"	"	"	"	"	"	"	-	-	
6 1/2	"	"	"	"	"	"	"	-	18,12	
5	0,2	"	"	"	"	"	"	-	29,59	
11	0,8	"	"	"	"	"	"	-	-	
6	0,8	"	"	"	"	"	"	-	34,36	

+ : 25 mg CuO-CaO M/M environ

+++ : 35 mg CuO-CaO M/M + 20 mg CaO environ

II.3.7.2. Essais de la Méthode de Dumas modifiée avec usage d'argon ou d'argon + hélium

Nous avons également effectué des essais avec de l'argon (Air liquide SA, pureté 98 %). Les quantités d'azote sous forme de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ était de 0,2 et 0,8 μg à 36,05 % d'azote 15. Les tubes ont été purgés avec de l'argon et chauffés au jaune. A une pression de 20 torr d'argon, aucune luminescence avant et après mise au four n'a été constatée. La pression du gaz était peut-être trop élevée. Trois séries d'expériences ont été effectuées avec un mélange d'hélium et d'argon. Les pressions partielles des gaz étaient les suivantes :

1ère série : hélium 10 torr, argon 5 torr

2ème série : hélium 10 torr, argon 10 torr

3ème série : hélium 15 torr, argon 9 torr

Avant la mise au four des échantillons, une luminescence sans spectre enregistrable fut constatée. Après combustion, la luminescence fut de courte durée.

II.3.7.3. Essais de la méthode de Dumas modifiée avec usage de xénon et d'hélium

Goleb et Middelboe (61) avaient utilisé un mélange de Xe et d'He afin d'amplifier la luminescence d'une faible quantité d'azote gazeux. Cependant, la durée de vie de la luminescence était courte, permettant de n'enregistrer qu'un ou deux spectres. Lors de nos essais préliminaires, nous avons travaillé avec de la glycine à 99 % d' ^{15}N . Le tube à décharge était placé sous vide durant 5 minutes, et chauffé au jaune sur la moitié de sa surface qui ne comportait pas la substance azotée. Ensuite, nous introduisions de l'hélium (hélium N48 Air Liquide SA, pureté 99,995 %) jusqu'à une pression de 700 torr; on laissait les gaz s'équilibrer durant 5 minutes, puis on faisait à nouveau le vide. On répétait cette opération une fois. On introduisait alors l'hélium puis le xénon (xénon N35 Air Liquide SA, pureté 99,995 %). Le tableau 23 donne les conditions et les résultats obtenus avec une première série d'échantillons.

L'enregistrement du spectre fut réalisé sous une tension de

Tableau 24

Conditions et résultats des essais de la méthode de Dumas modifiée avec usage de Xe et He. Mesure de la glycine à 99 % de ^{15}N .

Pression		µg d'azote	mg. de cataly- seur	Résultats % 15 _N	Remarques			
He (Torr)	Xe (Torr)							
10	1	0,3	50	34,79 15,56	} luminescence bleue pâle	1 semaine après, mêmes résultats 3 semaines après, luminescence, mais l'abondance isotopique n'est plus enregistrable		
3	0,5	0,3	40	77,61				
2	0,1	0,3	40	-				
1	1	0,3	30	5,94				
"	"	"	"	7,05				
10	0,1	0,3	40	11,63	} luminescence trop courte			
10	0,1	0,3	"	57,53				
"	"	"	"	31,02				
"	"	"	"	-				
"	"	"	"	-				
"	"	"	"	-				
"	"	"	"	-				
"	"	"	"	-				
"	"	"	50	11,42				
"	"	"	"	36,00				
10	1	1,2	40	19,24				
10	1	-	"	-				
"	"	1,3	"	1,23				
"	"	"	"	5,83				
"	"	"	"	70,44				
"	"	"	"	48,10				
"	"	"	"	83,86				
"	"	"	"	59,25				
"	"	"	"	65,87				

1280 V, et aux amplifications maximales des spectres, soit 10.000 fois pour l'azote 14 et 10.000 fois pour l'azote 15. Tous les échantillons furent luminescents, mais parfois non mesurables.

On constate que :

1. la presque totalité des échantillons présentent une luminescence dont l'analyse met en évidence l'azote.
2. une pression totale du mélange entre 2 et 10 torr permet une mesure de l'abondance isotopique de l'azote.
3. il y a soit une très grande dilution isotopique à l'intérieur du tube à décharge, soit une combustion très insuffisante.

Nous avons procédé à une seconde série d'expériences en augmentant et la quantité de glycine 99 % à analyser et la quantité des catalyseurs.

Le tableau 24 donne les conditions et résultats de ces essais.

On constate :

1. que plus la quantité d'azote est abondante, plus l'abondance isotopique mesurée est proche de l'abondance isotopique attendue.
2. qu'une quantité relativement importante de catalyseur semble nécessaire, malgré la faible quantité de substance.
3. qu'une différence trop grande des pressions partielles de l'hélium et du xénon semble provoquer une luminescence trop brève pour enregistrer un spectre.
4. que 10 torr d'hélium et 1 torr de xénon rendent le plus grand nombre d'échantillons luminescents.
5. que la durée de luminescence des échantillons est d'au moins une semaine.

Pour assurer une bonne détermination de l'abondance isotopique avec usage d'hélium et de xénon, nous avons décidé de ne pas utiliser des quantités d'azote inférieures à 1,5 ou 2 μg , et d'employer l'hélium à la pression de 10 torr et le xénon à la pression de 0,5 à 1 torr.

II.3.8. Emission différée et coloration de la luminescence

La stimulation haute fréquence de l'azote gazeux pur par l'ana-

lyseur d'azote 15 provoque une luminescence rose. Le rose est la coloration correspondant aux fréquences de transition électronique $C^3\pi_u \rightarrow B^3\pi_g$ des niveaux de vibration 2-0 du deuxième système positif de l'azote. C'est la coloration obtenue avec les standards gazeux Veb Berlin et avec des échantillons d'azote préparés selon la méthode à NaOBr. L'émission dans ces cas est, en général, immédiate.

Lors de la libération de l'azote par les méthodes de Dumas, de Dumas modifiée ou de Dumas modifiée avec usage de gaz rares, le tube à décharge présente une luminescence immédiate, ou parfois différée à la stimulation haute-fréquence. La luminescence différée l'est en général de 12 à 36 heures. Après ce délai un tube non luminescent le reste définitivement. Le phénomène de luminescence différée, qui n'influence pas la précision d'une mesure, reste mal expliqué. Certains tubes à décharge, à peine refroidis à la sortie du four, présentent au toucher et durant plusieurs heures des parois ayant une rugosité douce. On constate également de l'électricité statique sur les parois internes des tubes, car la poudre de catalyseur migre d'une paroi à l'autre avec une certaine rapidité.

Lorsque ces phénomènes disparaissent, le tube se prête alors à l'émission lumineuse.

Il est possible que dans les tubes, non luminescents immédiatement après la combustion, l'équilibre des gaz de l'échantillon ne soit pas réalisé, notamment l'absorption totale par le CaO des gaz tels H_2O , CO, HCN etc.

Lors de la stimulation des tubes à décharge, on peut observer les phénomènes colorés suivants :

1. 70 % des échantillons environ ont une luminescence rose immédiate.
2. 30 % des échantillons environ ont une luminescence bleue ou bleue-violette. Cette coloration bleue est en général le fait de molécules d'eau mal absorbées par le CaO. Dans ce cas, il suffit de laisser le tube à décharge sous stimulation haute fréquence durant 2-5 minutes. Durant ce temps, on voit la coloration rose apparaître progressivement. Même deux ans après, cette coloration rose apparaît immédiatement lors d'une stimulation du tube à décharge. La précision des résul-

tats des mesures de ^{15}N n'est pas influencée par ce phénomène. Vraisemblablement, la stimulation à haute fréquence provoque une accélération du mouvement des molécules gazeuses (par augmentation de la température) ce qui permet l'absorption totale des gaz résiduels par le CaO .

3. Quelques échantillons ont présenté une coloration rouge vif, carmin; les mesures d'abondance isotopiques étaient possibles, mais la luminescence était brève.

Deux échantillons ont présenté une coloration orange, ou qui passaient du rose à l'orange vif. La détermination de ^{15}N n'était alors plus possible.

Le tableau 25 résume les phénomènes de luminescence et de coloration de la luminescence des tubes.

La coloration rose est une preuve de pureté de l'azote gazeux et de l'absorption des autres gaz par le CaO . Une fois obtenue, elle est définitive.

II.4. Droites d'étalonnage de l'abondance isotopique de l'azote

Nous avons établi les droites d'étalonnage de l'abondance isotopique de l'azote après libération du gaz par la méthode de NaOBr et par la méthode de Dumas modifiée. Pour cette dernière, nous donnons la droite d'étalonnage pour des substances minérales et pour des substances organiques.

L'abondance isotopique mesurée se trouve en ordonnée et l'abondance isotopique théorique en abscisse.

Les substances azotées minérales étaient des sels $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ standards.

Les substances azotées organiques étaient du 2-diméthylamino-éthyl-(3-cyclohexyl propionate), de l'urée et du phénobarbital. Un grand nombre de valeurs de l'abondance isotopique ont été obtenues par dilution isotopique.

Tableau 25

Luminescence de l'azote lors de la stimulation haute fréquence

Manière de préparation des échantil- lons	Luminescence	% du nombre d'échan- tillons	Coloration initiale de la lumines- cence	Coloration permanente de	Temps d'é- tablissement de la colo- ration per- manente
NaOBr	immédiate	100	rose	rose	-
Dumas modifiée	immédiate	70	rose, ou bleu-violet	rose	1 à 5 min.
Dumas modifiée	différée	28	rose, ou bleu-violet	rose	1 à 5 min.
Dumas modifiée	différée	2	rouge, car- min ou oran- ge	- (dispari- tion de la luminescence	-

II.4.1. Droite d'étalonnage de l'abondance isotopique, après libération de l'azote gazeux par la méthode de NaOBr

Nous avons préparé et mesuré trois à cinq échantillons par valeur de l'abondance isotopique.

Le tableau 26 donne les résultats des mesures, leur moyenne ainsi que l'écart standard.

La figure 22 montre la droite d'étalonnage, qui se confond avec la droite théorique. Les points expérimentaux sont également marqués.

Les caractéristiques de la droite de régression sont indiquées au bas de la figure.

II.4.2. Droite d'étalonnage de l'abondance isotopique de l'azote libéré à partir de substances minérales par la méthode de Dumas modifiée

Nous avons préparé et mesuré deux à trois échantillons par valeur de l'abondance isotopique.

Le tableau 27 donne les résultats.

La figure 23 montre la droite d'étalonnage, qui se confond avec la droite théorique. Les points expérimentaux sont également marqués. Les caractéristiques de la droite de régression sont indiquées au bas de la figure.

II.4.3. Droite d'étalonnage de l'abondance isotopique de ¹⁵N libéré à partir de substances organiques par la méthode de Dumas modifiée

Nous avons préparé et mesuré trois échantillons par valeur de l'abondance isotopique.

Les échantillons, dont l'abondance théorique est précédée d'un astérisque, sont mesurés avec l'usage des gaz rares hélium et xénon.

Le tableau 28 donne les résultats.

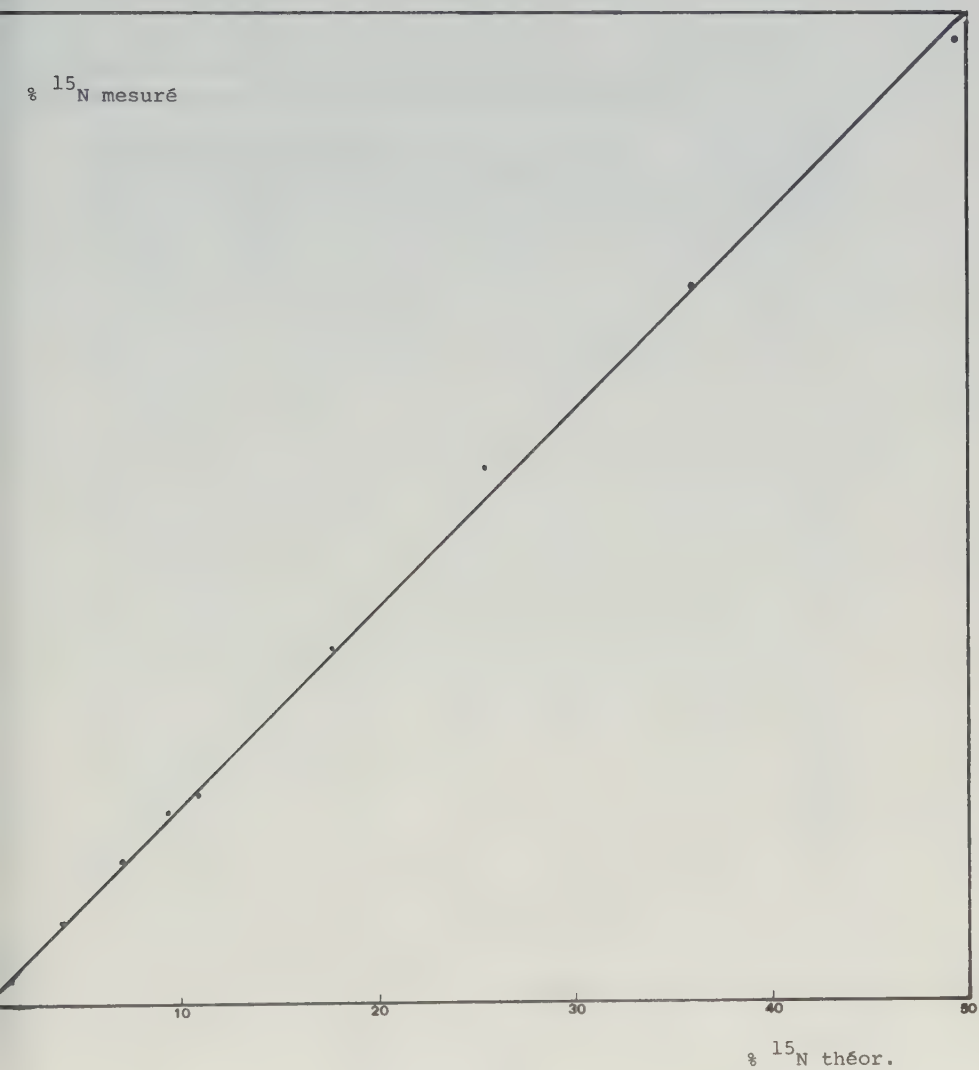
La figure 24 montre la droite d'étalonnage, qui se confond avec la droite théorique.

Les caractéristiques de la droite de régression est indiquée au bas de la figure.

Tableau 26

Déterminations de l'abondance isotopique d'échantillons de substances minérales. Azote libéré par NaOBr.

% ^{15}N théorique	% ^{15}N mesuré					Moyenne % ^{15}N	σ
	Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3	Ech. 4	Ech. 5		
0,366	0,40	0,37	0,363	0,357	0,38	0,374	0,016
0,718	0,725	0,697	0,692	-	-	0,704	0,017
1,36	1,32	1,35	1,37	1,32	-	1,34	0,024
4,15	4,23	4,18	4,19	4,13	4,28	4,20	0,05
7,01	6,97	7,10	7,05	7,08	7,30	7,10	0,12
9,45	9,61	9,31	10,07	9,80	9,60	9,67	0,28
10,90	10,05	10,58	11,03	-	-	10,55	0,49
17,70	18,30	17,60	17,90	18,70	17,20	17,94	0,58
25,45	28,10	27,40	27,60	26,10	27,50	27,34	0,74
36,05	35,80	34,90	37,11	36,60	36,20	36,12	0,83
49,25	47,80	47,30	49,10	49,70	48,80	48,54	0,97



Droite de régression :

$$y = 0,15 + 0,99 x$$

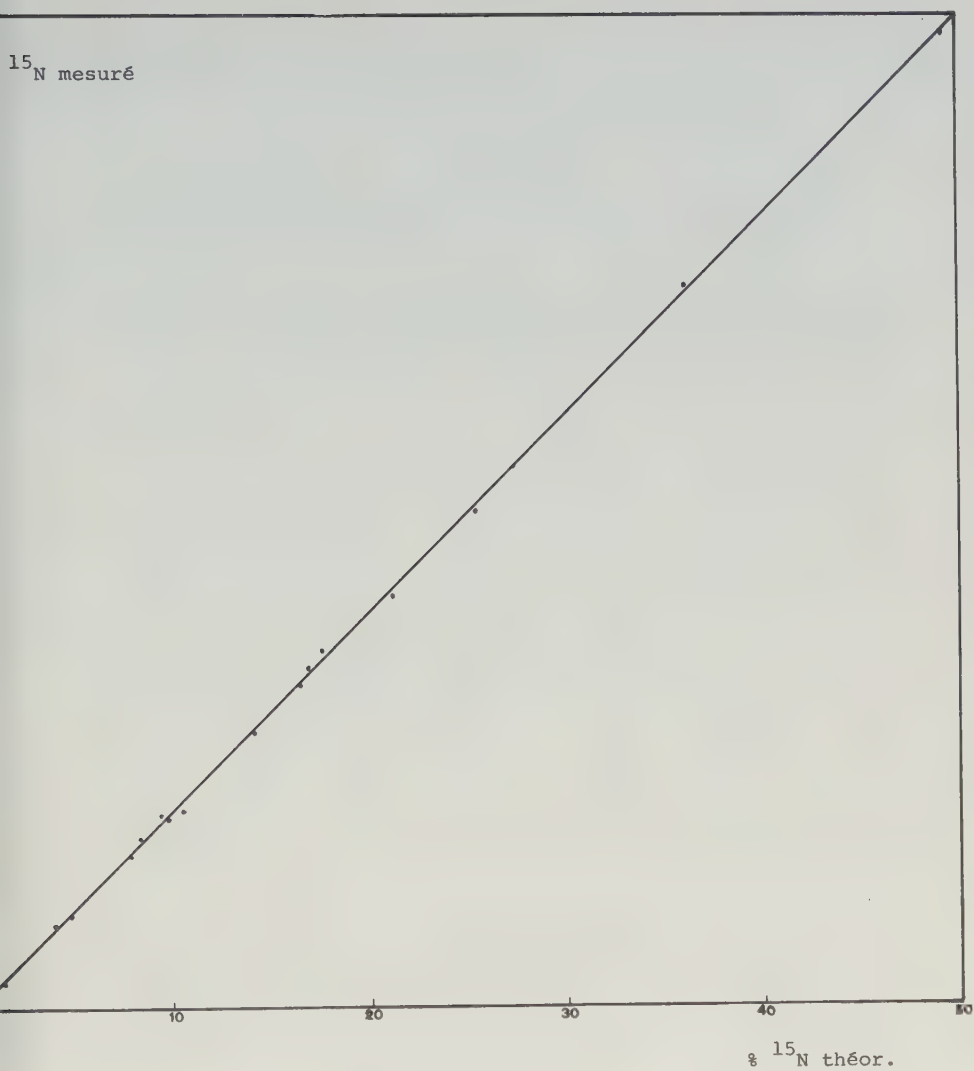
Figure 22

Droite d'étalonnage de l'abondance isotopique de ¹⁵N.

Azote libéré par NaOBr.

Tableau 27
Déterminations de l'abondance isotopique de ^{15}N . Azote libéré
à partir de substances minérales par la méthode de Dumas modifiée.

Abondance isotopique théorique ‰ ^{15}N	Abondance isotopique mesurée ‰ ^{15}N				
	Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3	moyenne	σ
0,366	0,362	0,382	0,387	0,377	0,013
0,718	0,721	0,704	0,722	0,715	0,01
1,36	1,36	1,32	1,33	1,34	0,02
4,15	4,24	4,02	4,23	4,16	0,12
4,84	4,75	4,66	4,53	4,65	0,11
7,86	7,85	7,54	7,85	7,75	0,18
8,32	8,37	8,58	8,07	8,34	0,25
9,31	9,67	9,49	-	9,58	0,13
9,62	9,52	9,65	-	9,45	0,28
10,50	9,95	9,83	-	9,89	0,08
14,06	14,38	13,49	-	13,94	0,62
16,45	16,22	16,12	-	16,17	0,07
16,85	16,84	16,63	17,37	16,94	0,38
17,70	17,31	18,47	17,65	17,81	0,59
21,25	21,46	19,86	-	20,66	1,13
25,45	25,85	25,53	22,91	24,76	1,61
27,44	27,67	27,02	-	27,35	0,46
36,05	35,66	37,1	-	36,38	1,02
49,25	48,50	49,7	48,9	49,03	0,61



Droite de régression :

$$y = -0,07 + 0,99 x$$

Figure 23

Droite d'étalonnage de l'abondance isotopique de ^{15}N . Azote libéré à partir de substances minérales par la méthode de Dumas modifiée.

Tableau 28

Déterminations de l'abondance isotopique de ^{15}N . Azote libéré
à partir de substances organiques par la méthode de Dumas modifiée

Abondance isotopique théorique % ^{15}N	Abondance isotopique mesurée % ^{15}N				
	Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3	moyenne	σ
*6,32	5,70	6,45	6,77	6,31	0,55
*14,02	13,60	14,10	14,37	14,02	0,39
21,70	21,00	21,90	22,40	21,76	0,71
*24,67	26,54	25,08	-	25,81	1,03
*29,94	30,60	32,01	31,29	31,30	0,70
30,70	32,19	30,38	30,17	30,91	1,11
*55,70	54,67	52,34	56,21	54,41	1,95
56,88	56,14	56,15	56,26	56,18	0,06
59,62	62,42	62,71	62,68	62,60	0,16
60,61	59,96	60,18	62,52	60,88	1,41
*75,32	74,19	71,65	73,60	73,15	1,32
83,00	86,03	80,09	81,52	82,55	3,10
83,60	82,22	86,28	86,28	84,92	2,34

* Les valeurs avec astérisques sont celles d'échantillons
mesurés avec usage de gaz rares hélium, 10 Torr, et xénon
0,15 Torr.

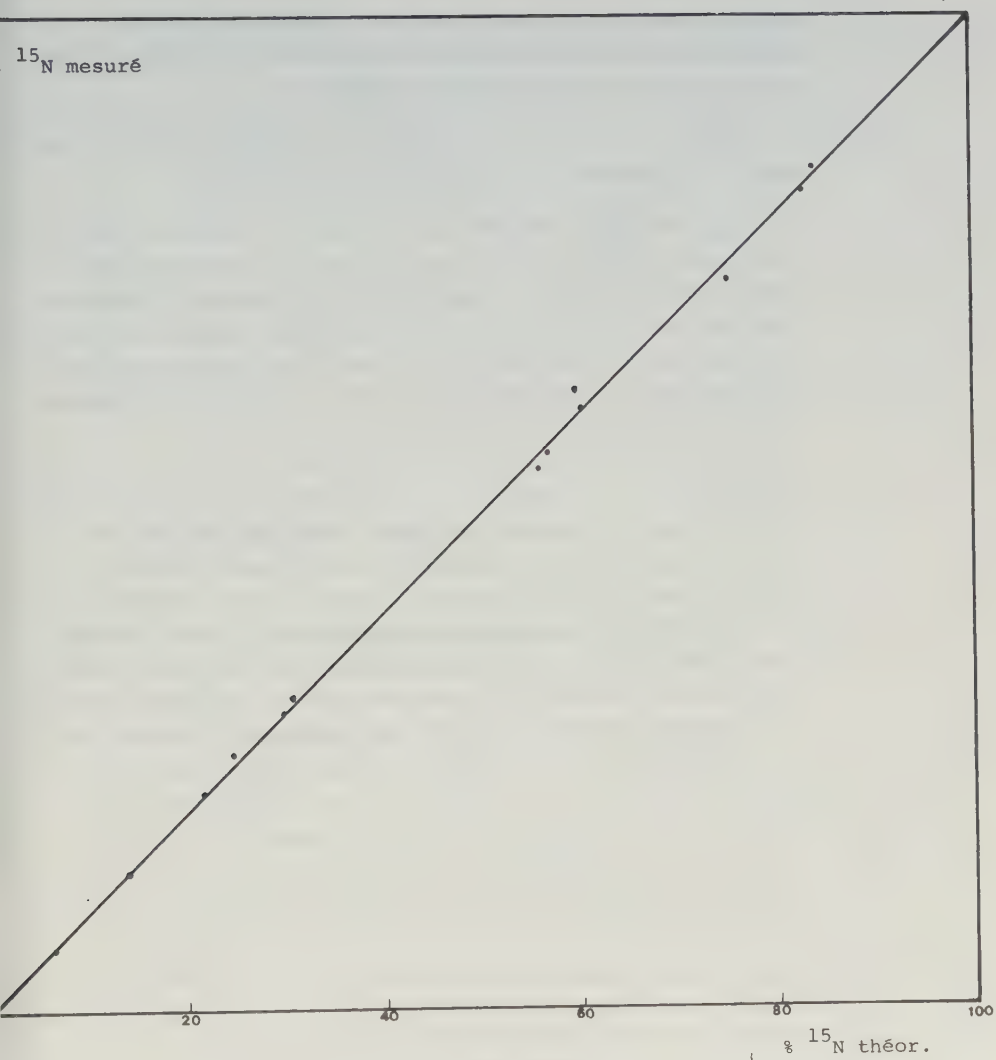


Figure 24

Droite d'étalonnage de l'abondance isotopique de ^{15}N . Azote libéré à partir de substances organiques par la méthode de Dumas modifiée.

II.5. Mesure isotopique de l'azote par spectrométrie de masse. Comparaison des valeurs obtenues par spectrométrie de masse avec celles obtenues par spectrométrie d'émission.

L'abondance isotopique de l'azote peut être déterminée de deux manières différentes par la spectrométrie de masse :

1. à partir des pics 28, 29, 30 de l'azote. Ce dernier est préalablement libéré de l'échantillon par les mêmes méthodes que celles utilisées en spectrométrie d'émission. Rittenberg, Taylor, Desaty et Beynon (74) ont mis en évidence les limitations de cette méthode. Elles sont dues spécialement à la présence de radicaux dont le poids moléculaire interfère avec celui des différents azotes.
2. à partir de l'ion moléculaire du produit azoté marqué en ^{15}N et de l'ion moléculaire du produit azoté non marqué. Waller et coll. (75) ont, les premiers, utilisé cette méthode. Afin de comparer les valeurs d'abondances isotopiques de l'azote obtenues par spectrométrie de masse et par spectrométrie d'émission, nous avons préparé cinq abondances isotopiques différentes. La substance azotée était de l'actébral (2 diméthylaminoéthyl- -cyclohexyl propionate) (Figure 25).

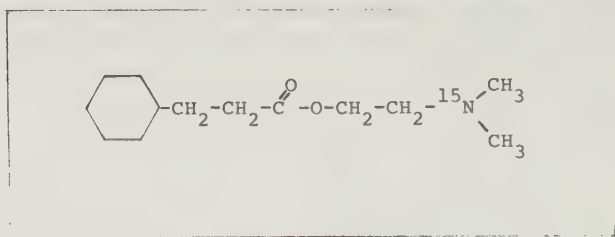


Figure 25
Molécule d'Actébral

Détermination de l'abondance isotopique de l'actébral par spectrométrie de masse

L'abondance isotopique de l'azote est établie de la manière suivante :

Nous mesurons

1. l'intensité des pics 226 et 227 de l'actébral non marqué, soit respectivement M-1 et M.
2. l'intensité des pics 227 et 228 de l'actébral marqué, soit respectivement (M-1)* et M*.

$$227 \text{ corrigé} = (M-1)^* - \frac{M-1}{M} \cdot M^*$$

$$228 \text{ corrigé} = M^* - \frac{X}{100} (M-1)^*$$

La contribution isotopique du pic 227 de l'actébral non marqué

$$\frac{X}{100} = 0,133$$

La valeur $\frac{M-1}{M} = 0,37$

$$\begin{array}{l} \text{Abondance isotopique de} \\ \text{l'isotope marqué en \% :} \end{array} \quad \frac{228c \cdot 100}{227c + 228c}$$

Chaque spectre a été enregistré trois fois.[▲]

La valeur mesurée par spectrométrie de masse des abondances isotopiques des mélanges d'actébral est donnée dans le tableau 29. Les mêmes mélanges isotopiques d'actébral ¹⁵N ont été mesurés par spectrométrie d'émission, après libération de l'azote gazeux par la méthode de Dumas modifiée. Pour chaque mélange, trois à quatre déterminations ont été effectuées, avec les 18 µg d'azote chacune. Le tableau 30 donne les résultats obtenus.

Le tableau 31 permet la comparaison des valeurs obtenues par spectrométrie de masse, par spectrométrie d'émission et celles calculées. L'écart standard des valeurs calculées est établi avec l'erreur sur les pesées et la dilution et l'erreur sur la mesure de l'enrichissement de l'actébral ¹⁵N.

La figure 26 montre le spectre de masse de l'actébral à 0,366 % d'azote ¹⁵N et la figure 27 celui de l'actébral à 98,498 % d'azote ¹⁵N.

[▲] Les spectres de masse ont été enregistrés au Centre de Spectrométrie de masse de l'Université de Genève.

Tableau 29
Abondances isotopiques déterminées par spectrométrie de masse.

Abondance isotopique	Pic 227*	Pic 228*	% ¹⁵ N	Moyenne du % ¹⁵ N	b
1	3,90	1,95	31,03	31,03	0
	5,30	2,65	31,03		
2	2,40	2,15	53,28	56,39	4,40
	2,60	2,70	59,51		
3	5,55	5,95	60,87	60,13	1,04
	5,60	5,80	59,40		
4	2,70	2,00	45,55	42,98	3,64
	1,85	1,20	40,40		
5	2,90	4,05	72,32	71,70	0,87
	2,80	3,80	71,08		

Tableau 30
Abondances isotopiques déterminées par spectrométrie
d'émission

Abondance isotopique	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4	Moyenne	σ
1	31,90	31,80	30,31	30,45	31,12	0,85
2	51,55	54,52	55,70	55,49	54,32	1,91
3	60,12	62,70	60,95	-	61,25	1,32
4	42,98	38,84	37,35	33,37	38,13	3,94
5	67,36	65,77	67,60	-	66,91	0,99

Tableau 31
Comparaison de la valeur de l'abondance isotopique obtenue
par spectrométrie de masse et par spectrométrie d'émission
et celles calculées

Abondance isotopique	valeurs obtenues par SM		valeurs obtenues par SE		valeurs calculées	
	moy.	σ	moy.	σ	moy.	σ
1	31,03	0	31,12	0,85	32,06	0,43
2	56,39	4,40	54,32	1,91	56,03	0,74
3	60,13	1,04	61,25	1,32	61,26	0,81
4	42,98	3,64	38,13	3,94	38,31	0,50
5	71,70	0,87	66,91	0,99	69,43	0,98

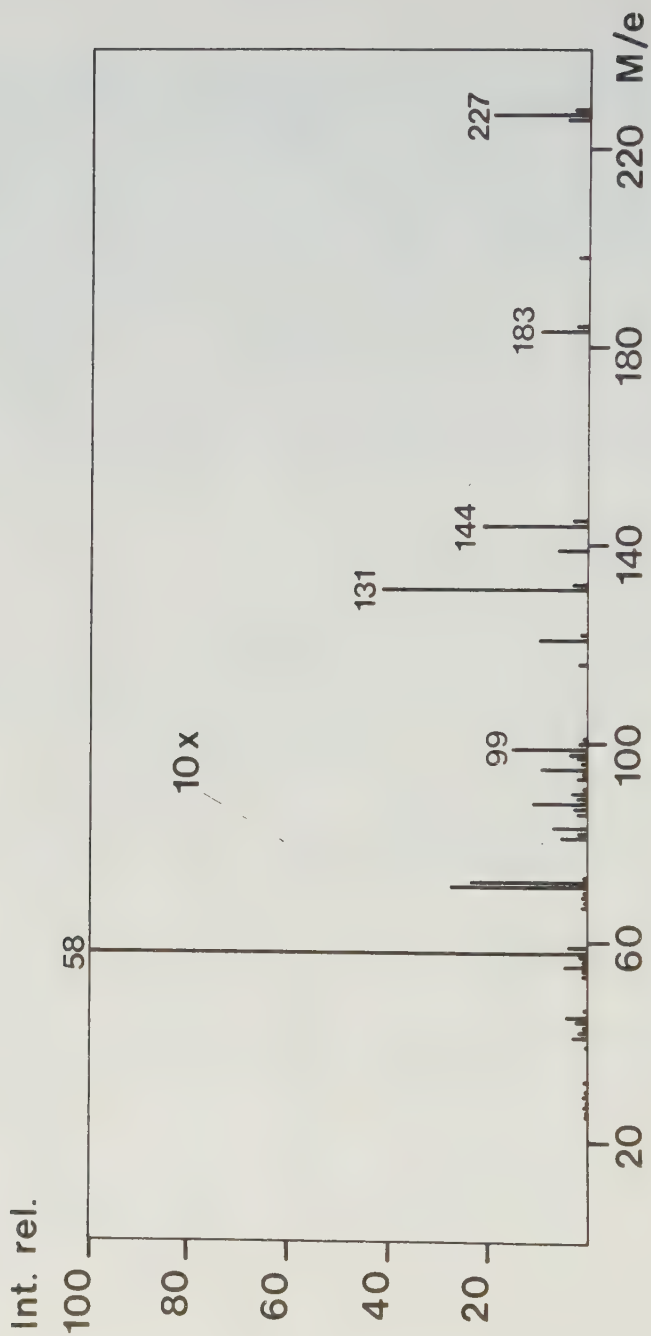


Figure 26

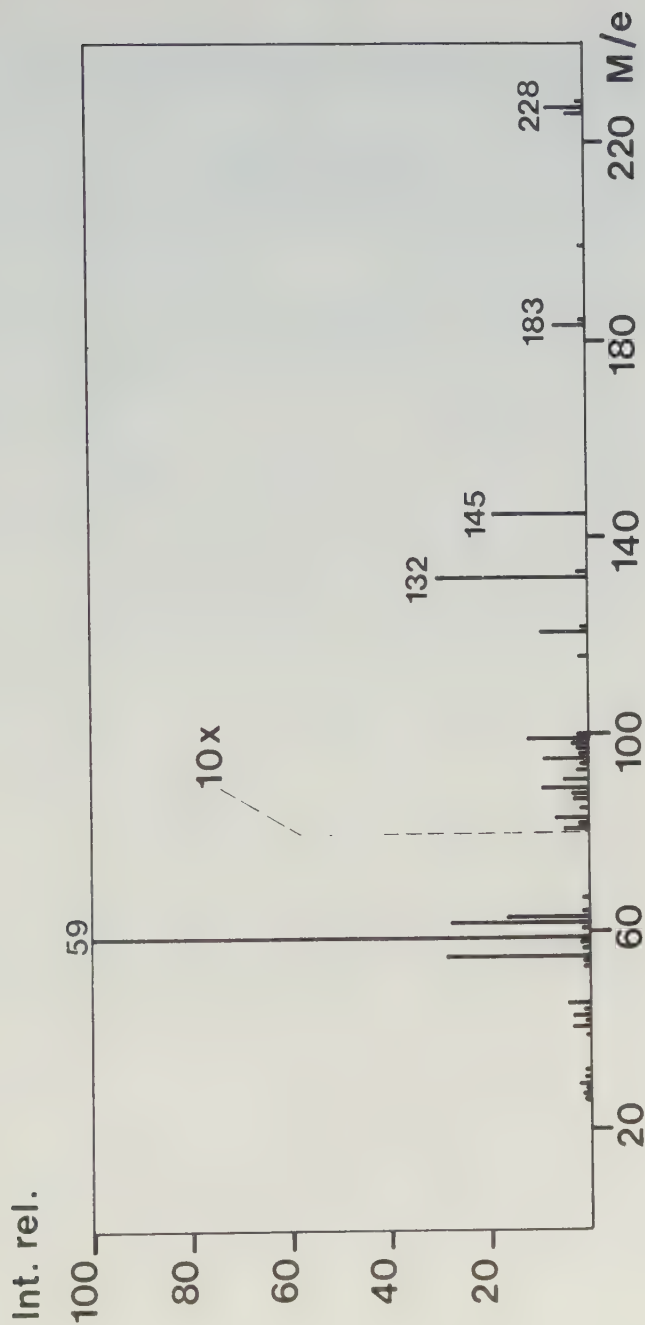


Figure 27

II.6. Le dosage d'azote par dilution isotopique

L'analyse par dilution isotopique fut introduite par Hevesy et Hofer en 1934, et se développa surtout à partir des travaux de Rittenberg et Forster en 1940.

Nous avons utilisé la dilution isotopique pour obtenir des substances standards avec des pourcentages de ^{15}N connu et pour le dosage de l'azote.

Lorsqu'on utilise un isotope stable, il faut différencier deux notions : celle d'abondance et celle d'enrichissement.

L'abondance est la concentration isotopique de l'isotope stable et s'exprime en atome %. Par exemple, l'abondance naturelle de ^{15}N est de 0,366 %.

L'enrichissement d'un isotope stable s'exprime en atome % en excès. C'est la valeur de l'abondance de l'isotope moins la valeur de l'abondance de l'isotope naturel.

Par exemple, un azote ayant une abondance de 0,58 atome %, a un enrichissement de $0,58 - 0,37 = 0,21$ atome % en excès.

Lors de la dilution de l'isotope stable très abondant par l'isotope moins abondant, par exemple 50 % de ^{15}N par 10 % de ^{15}N , l'enrichissement est de $50 \% - 10 \% = 40 \%$ de ^{15}N en excès.

Lors du dosage de l'azote par dilution isotopique, il faut tenir compte des masses de l'azote 14 et de l'azote 15. La masse relative équivalente de l'azote est de 14,00752. Cette valeur n'est valable que pour une composition naturelle des isotopes de l'azote ($^{14}\text{N} = 99,634 \%$ et $^{15}\text{N} = 0,366 \%$). Elle est dépendante de la composition des isotopes et peut avec des enrichissements d'azote 15 croissants s'élever jusqu'à 15,00486. Ce dernier chiffre représente une augmentation pondérale de 7 %.

II.6.1. Méthodes de dilution isotopique

Il y a trois méthodes générales pour quantifier un élément par dilution isotopique : la dilution directe, la dilution inverse et la double dilution.

Ces méthodes sont basées sur le même principe fondamental, mais

diffèrent quant à la technique et aux circonstances d'application.

1. la dilution isotopique directe

La dilution isotopique directe est la détermination de l'élément naturel, ou peu enrichi, par dilution de son élément le plus enrichi.

Cette technique est utilisée pour déterminer la quantité d'azote naturel ou peu enrichi, difficile à séparer par des méthodes conventionnelles d'une solution ou d'un mélange de constituants.

Ainsi, si l'on a un mélange de composés dans lequel on désire déterminer la quantité d'azote m d'un constituant A , on ajoute au mélange une quantité connue, m' de A , enrichie en atome % excès connu E_o de l'isotope. Un aliquot de A est isolé pur du mélange et analysé pour connaître son enrichissement E . La quantité de produit A originellement présent dans le mélange peut être calculée à l'aide de l'équation

$$m = \left(\frac{E_o}{E} - 1 \right) m'$$

ou $m' =$ quantité substance marquée

$E_o =$ enrichissement de l'isotope marqué

$E =$ enrichissement de l'isotope non marqué

$m =$ quantité inconnue de l'isotope non marqué

Si l'on tient compte de la différence de masse de l'azote 14 et 15, ou de la différence de masse de la substance azotée possédant un ou plusieurs atomes d'azote, on a :

$$m = \left(\frac{E_o}{E} - 1 \right) \frac{M_1}{M_1 + \frac{E_o}{100}} \cdot m'$$

ou $M_1 =$ poids moléculaire de l'élément ou de la substance isotopique non marquée

2. La dilution isotopique inverse

La dilution isotopique inverse est la détermination de l'élément enrichi par son élément naturel ou peu enrichi.

La dilution isotopique inverse est en fait l'inverse de la dilution isotopique directe. Elle est applicable lorsqu'un système contient une quantité inconnue de substance marquée isotopiquement et d'enrichissement E_0 connu. Pour déterminer la quantité m' de la substance marquée présente, une quantité connue m de substance naturelle ou peu enrichie est ajoutée. Après équilibre du système, un aliquot est prélevé, purifié, et son enrichissement E mesuré. On calcule m' selon l'équation:

$$m' = \frac{E}{E_0 - E} \cdot \frac{M_1 + \frac{E_0}{100}}{M_1} \cdot m$$

3. La double dilution isotopique

Nous parlerons de la double dilution isotopique au paragraphe IV.2.1. C'est la technique que nous utilisons pour le dosage d'azote des échantillons biologiques.

4. Calcul de l'enrichissement d'une dilution isotopique

La dilution isotopique permet de doser l'azote d'un échantillon. Elle permet également, en calculant l'abondance isotopique théorique d'un mélange final, de connaître si une combustion de Dumas a totalement libéré l'azote d'un échantillon. Le calcul de l'abondance isotopique d'un échantillon s'effectue selon l'équation

$$E = \frac{E_0 \cdot m' \cdot \frac{M_1}{M_1 + E_0}}{m + m' \cdot \frac{M_1}{M_1 + \frac{E_0}{100}}} + \% \text{ } ^{15}\text{N excès}$$

Mode opératoire du dosage de l'azote par dilution isotopique

Nous préparons une solution de substance azotée avec une concentration et un enrichissement connus. La quantité utilisée pour le dosage de l'azote d'un échantillon est prélevée et mesurée à l'aide de microcaps* de 5, 10, 20, 30 ou 50 μ l.

Afin d'introduire la solution au fond du tube à décharge, nous avons des microcaps de 5, 10, 20 μ l à l'intérieur d'une microcaps de support de 50 μ l longue de 10 cm. (figure 28).

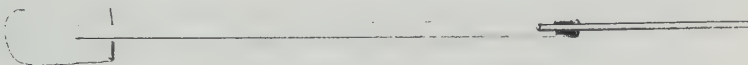


Figure 28

Microcaps de dilution pour le dosage de l'azote.

II.6.2. Mesure de % 15 N d'échantillons par dilution isotopique directe et inverse

Pour estimer la précision du dosage de l'azote par la dilution isotopique, nous avons effectué trois sortes de dilutions :

1. dilution de substances azotées minérales par des substances azotées minérales
2. dilution de substances azotées minérales par des substances azotées organiques
3. dilution de substances azotées organiques par des substances azotées organiques.

Les quantités et les enrichissements des substances utilisées lors de ces dilutions isotopiques n'ont pas été celles qu'exigent les conditions optimales du dosage.

En effet, ces conditions optimales sont :

1. que la quantité de substance à doser et la quantité de substance de dilution soient égales
2. que la différence d'enrichissement entre la substance à doser et la substance de dilution soit la plus élevée possible.

Il nous a semblé intéressant d'observer la valeur de dosages faits dans des conditions qui ne sont peut-être pas tout à fait optimales.

* Drummond Scientific Company USA

Les tableaux 32, 33 et 34 présentent les substances azotées utilisées, leur abondance isotopique, la quantité d'azote de dilution, l'abondance isotopique théorique du mélange, les valeurs et la moyenne de l'abondance isotopique des échantillons, la différence entre l'abondance isotopique théorique et celle déterminée et enfin le pourcentage d'erreur relative sur la valeur de mesure de l'abondance isotopique.

On constate que le pourcentage d'erreur relative sur la mesure de l'abondance isotopique est particulièrement faible lors de dilution de substances minérales azotées identiques; il s'élève à $1,36 \pm 1,2 \%$.

Le pourcentage d'erreur relative sur la valeur de l'abondance isotopique obtenue lors de dilution de substances mixtes, organique et minérale est de $3,05 \pm 3,4\%$. Il est logique que le pourcentage d'erreur relative soit plus élevé qu'avec des substances identiques. En effet, les liaisons dans lesquelles sont impliqués les atomes d'azote n'ont pas toutes la même énergie. Lors de la combustion, les liaisons les plus faibles sont scindées le plus facilement.

Le pourcentage d'erreur relative sur la valeur de l'abondance isotopique obtenue lors de dilution de substances organiques identiques est de $2,64 \pm 1,8$. Cette valeur est supérieure à celles des dilutions minérales et mixtes, malgré une différence d'abondance isotopique plus élevée entre les substances. Elle est probablement due aux quantités beaucoup plus petites mises en jeu lors de la dilution isotopique organique.

II.6.3. Dosage de l'azote par dilution isotopique directe et indirecte

Dans le tableau 35, nous présentons les résultats de la dilution isotopique directe minérale, mixte et organique et dans le tableau 36 les résultats de la dilution isotopique indirecte minérale, mixte et organique.

On constate que lors du dosage par dilution isotopique minérale directe ou indirecte à l'aide de substances identiques, un enrichissement de dilution inférieur à 25 % donne une erreur relative de mesure de 5 %. Avec des substances mixtes et un enrichissement inférieur à 75 % l'erreur relative est supérieure à 5 %.

Tableau 32

Détermination quantitative d'azote par dilution isotopique minérale (méthode de combustion selon Dumas modifiée)

Subst.	Abondance isotopique % ^{15}N	Quantité d'azote μg	Subst.	Abondance isotopique % ^{15}N	Quantité d'azote (μg)	Abondance isotopique théor. % ^{15}N	Ab. isotopique déterm. % ^{15}N Echantillon			Différ. entre ab. théo/dét.	% erreur relative
							1	2	3		
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Veb)	36,05	4,04	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Veb)	0,366	13,76	8,32	8,372	8,58	8,073	8,34	0,02
"	36,05	2,02	"	0,366	13,76	4,84	4,75	4,66	4,53	4,69	0,15
"	36,05	4,04	"	8,23	7,01	16,45	16,22	16,12	-	16,17	0,28
"	36,05	8,09	"	10,50	4,00	27,44	27,67	27,02	-	27,49	0,00
"	17,70	8,05	"	7,01	4,11	14,06	14,38	13,49	-	13,94	0,12
"	10,50	8,00	"	7,01	4,11	9,31	9,67	9,49	-	9,58	0,27
"	36,05	8,09	"	7,01	8,23	21,25	21,46	19,86	-	20,66	0,59
"	36,05	4,04	"	10,50	12,00	16,85	16,84	16,63	17,37	16,94	0,09
"	17,7	4,02	"	7,01	12,34	9,62	9,52	9,65	-	9,63	0,01
"	10,5	4,00	"	7,01	12,34	7,86	7,85	7,54	7,85	7,75	0,11
											1,40

Tableau 33

Détermination quantitative d'azote par dilution isotopique mixte, organique et minérale (méthode de combustion selon Dumas modifiée)

Subst.	Abondance isotopique § 15N	Quantité d'azote µg	Subst.	Abondance isotopique § 15N	Quantité d'azote (µg)	Abondance isotopique théor. § 15N	Ab. isotopique déterm. Echantillon min.			diff. entre ab. isot. théo/dét.	% erreur relative mesure
							1	2	moy.		
Actébral	98,498	2,95	NH ₄ Cl	0,366	6,88	28,49	31,06	30,87	30,96	2,47	8,66
"	"	"	"	36,05	12,14	48,30	51,50	50,45	50,97	2,59	5,28
"	"	9,25	"	25,45	8,10	60,26	60,18	62,52	60,98	0,72	1,19
"	"	18,50	"	36,05	4,04	86,85	86,43	86,65	86,54	0,31	0,35
"	"	"	"	0,366	8,09	67,23	67,32	-	67,32	0,09	0,13
Glycine	99,1	12,06	"	36,05	4,04	83,27	87,97	87,88	87,92	4,65	5,58
"	"	6,15	"	25,45	8,10	56,31	56,19	-	56,19	0,12	0,21

Tableau 34

Détermination quantitative d'azote par dilution isotopique organique (méthode de combustion selon Dumas modifiée avec usage de He et Xe)

Subst.	Abondance isotopique 15N	Quantité d'azote µg	Subst.	Abondance isotopique 15N	Quantité d'azote (µg)	Abondance isotopique théor. 15N	Ab. isotopique déterminée Echantillon			Diff. entre ab. isot. théo/dét.	% erreur relative mesure
							1	2	3 moy.		
Actébral	98,488	0,29	Actébral	0,366	1,71	14,02	13,60	14,10	14,37	14,02	0,00
"	"	0,14	"	"	2,14	6,32	5,70	6,45	6,77	6,24	0,08
"	"	0,59	"	"	1,28	29,94	30,60	32,01	31,29	31,30	1,36
"	"	1,18	"	"	0,85	55,70	54,67	52,34	56,21	54,26	1,44
"	"	1,48	"	"	0,42	75,32	74,19	71,65	73,60	73,14	2,18
Phénobar- bital	99,9	0,57	Phénobar- bital	0,366	1,65	24,67	26,54	25,08	-	25,81	1,14
											4,62

Tableau 35

Dosage d'azote par dilution isotopique directe

Dilution isotopique	µg N mesuré	% erreur relative de la mesure	Enrichissement de dilution
minérale	13,71	0,36	35,68
	14,31	3,99	35,68
	8,60	4,50	29,04
	4,00	0,05	25,55
	4,33	5,35	10,69
	2,85	30,52	3,49
	8,94	8,62	29,04
	11,79	1,75	25,55
	12,30	5,02	10,69
	14,84	20,17	3,49
mixte	6,10	11,19	98,13
	9,02	25,69	62,44
	9,28	22,58	73,04
	4,19	3,53	62,44
	8,05	0,50	98,13
	2,48	38,49	62,44
	8,16	0,69	73,04
organique	1,71	0,00	98,13
	2,17	1,54	98,13
	1,20	6,29	98,13
	0,91	6,22	98,13
	0,48	12,59	98,13
	1,55	6,06	99,53

Tableau 36
Dosage d'azote par dilution isotopique inverse

Dilution isotopique	µg N mesuré	% erreur relative de la mesure	Enrichissement de la dilution
minérale	4,06	0,37	35,68
	1,94	3,82	35,68
	3,87	4,37	29,04
	8,09	0,05	25,55
	7,64	5,09	10,69
	11,52	43,93	3,49
	7,45	7,94	29,04
	4,12	1,83	25,55
	4,03	0,25	10,69
	3,33	16,81	3,49
mixte	3,33	12,57	98,13
	3,98	34,55	62,44
	8,07	12,74	73,04
	17,85	3,56	62,44
	18,60	0,50	98,13
	19,62	62,59	62,44
	6,11	0,76	73,04
organique	0,29	0,70	98,13
	0,14	1,62	98,13
	0,63	6,80	98,13
	1,11	5,81	98,13
	1,31	11,18	98,13
	0,60	5,07	99,53

II.7. La constante d'équilibre de l'azote isotopique gazeux

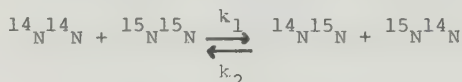
Nous avons vu au paragraphe I.3.7. que le calcul de l'abondance isotopique s'effectue pour une abondance d'azote inférieure à 40 % selon l'équation

$$\text{atome \% } ^{15}\text{N} = \frac{100}{2R+1} \quad \text{ou } R = \frac{I_{28}}{I_{29}} \quad (1)$$

et pour une abondance supérieure à 40 % selon l'équation

$$\text{atome \% } ^{15}\text{N} = \frac{100}{\frac{R'}{2} + 1} \quad \text{ou } R' = \frac{I_{29}}{I_{30}} \quad (2)$$

Ces équations ne sont naturellement applicables que lorsque l'équilibre est réalisé. Rappelons que la constante d'équilibre de l'azote isotopique est égale à 4 entre les températures de 273°K et 1150°K.



$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{(^{14}\text{N}^{15}\text{N})^2}{(^{14}\text{N}^{14}\text{N})(^{15}\text{N}^{15}\text{N})} = \frac{(I_{29})^2}{(I_{28})(I_{30})} = 4$$

On peut également calculer l'abondance isotopique selon l'équation

$$\text{atome \% } ^{15}\text{N} = \frac{2(I_{30}) + I_{29}}{2(I_{28} + I_{29} + I_{30})} \cdot 100 \quad (3)$$

On peut admettre que l'équilibre complet du gaz intervient durant l'analyse de composés enrichis d'un seul atome ^{15}N comme NH_4Cl . Cela ne signifie pas que l'échantillon doit être pur, mais que les autres molécules présentes ne doivent pas contenir d'azote. Nous avons soumis le standard gazeux (Veb Berlin) et les sels $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ préparés par la méthode de NaOBr et de Dumas au calcul de la constante d'équilibre, en supposant que les

trois pics du spectre de l'azote obtenu par spectrométrie d'émission étaient identiques aux pics 28, 29 et 30 obtenus par un spectromètre de masse. Nous avons également calculé l'abondance isotopique à l'aide des équations 1, 2 et 3. Les tableaux 37 et 38 donnent les caractéristiques des substances minérales et organiques utilisées, le mode de libération de l'azote gazeux, l'intensité des différents pics, les valeurs calculées de l'abondance isotopique et de la constante d'équilibre. Nous constatons que les valeurs de K sont en moyenne constantes et s'élèvent à $4,89 \pm 0,26$ et $4,88 \pm 0,36$. Celles obtenues avec les standards gazeux fournis par le constructeur de l'appareil sont du même ordre de grandeur. Nous pensons que le pic non utilisé dans les équations 1 et 2 est peu précis à cause de sa faible intensité et de la contribution des pics voisins; d'où K différent de 4. Nous appellerons donc cette valeur non K, car elle n'est pas une constante réelle d'équilibre, mais Q. Pour la spectrométrie d'émission Q est constant et égal à 4,88.

Deux auteurs, Desaty (70) et Schmidt (77) ont préparé des échantillons par la méthode de Dumas et ont mesuré l'abondance isotopique de l'azote à l'aide des intensités 28, 29 et 30 des pics obtenus par spectrométrie de masse. Ils ont montré que l'utilisation des équations 1 et 2 n'est possible que si l'équilibre statistique de distribution par paires au hasard du gaz est réalisée. Cela est naturellement toujours le cas avec un seul atome d'azote dans une molécule.

Ils ont prouvé que, lorsqu'une molécule possède deux atomes d'azote dont l'un est marqué isotopiquement, et que leurs liaisons sont d'énergies différentes, telles C-N, N-P, N-H, l'équilibre gazeux peut ne pas être réalisé.

Dans ce cas l'équation 3 de l'abondance isotopique est toujours précise, mais les équations 1 et 2 donnent des résultats erronés. Et surtout, la constante d'équilibre Q diminue ou augmente au minimum de 2 à 3 unités et varie jusqu'à 20 ou 25 unités. Cette énorme variation de Q, nous l'avons vérifiée, non pas avec une molécule comportant deux atomes d'azote, l'un naturel et l'autre marqué et engagés dans des liaisons hétérogènes,

Tableau 37

SE
Constante d'équilibre isotopique de substances minérales mesurée à partir des spectres obtenus par

Substance	Prép.	I ₂₈	I ₂₉	I ₃₀	% ¹⁵ N théorique	% ¹⁵ N déterminé selon équation			Q	Q moy	σ
						1	2	3			
¹⁵ NH ₄ Cl	NaOBr	4,80	11,500	5,60	49,25	51,82	54,46	49,35	4,92		
¹⁵ NH ₄ Cl	Dumas	4,73	10,76	5,12	49,25	50,71	53,06	48,31	4,77		
¹⁵ NH ₄ Cl	Dumas	11,80	15,87	4,20	36,05	38,07	36,21	33,89	4,83		
¹⁵ NH ₄ Cl	Dumas	8,62	9,55	2,25	36,05	34,40	35,66	32,03	4,69		
¹⁵ NH ₄ Cl	Dumas	10,46	8,00	1,43	27,49	27,30	27,67	26,34	4,29		
¹⁵ N gaz stand. Berlin		9,45	6,87	1,04	27,49	25,77	26,68	23,24	5,11	4,895	+0,26
¹⁵ N gaz stan. Berlin		8,68	6,28	0,89	25,60	25,42	26,56	22,08	5,24		
¹⁵ NH ₄ Cl	Dumas	8,75	6,00	0,75	25,45	24,19	25,53	25,00	5,01		
¹⁵ NH ₄ Cl	Dumas	14,10	10,45	1,7	25,45	26,38	27,06	24,55	4,70		
¹⁵ NH ₄ Cl	Dumas	13,20	9,40	1,35	25,45	25,26	26,28	22,31	4,95		
¹⁵ NH ₄ Cl	Dumas	13,23	7,20	0,76	21,32	20,57	21,46	17,43	5,15		
¹⁵ NH ₄ Cl	Dumas	10,72	5,28	0,50	21,32	19,07	19,86	16,19	5,09		

Tableau 38
Constante d'équilibre isotopique d'une substance organique mesurée à partir des spectres obtenus
par SE

Substance	Prép.	I ₂₈	I ₂₉	I ₃₀	% 15N théo- rique	% 15N déterminé selon équation			Q	Q moy	σ
						1	2	3			
Actébral	Dumas	3,18	9,93	5,95	55,87	57,26	60,97	54,52	5,21		
		3,24	8,87	4,81	55,87	54,63	57,80	52,03	5,04		
		2,67	8,81	5,67	55,87	58,74	62,26	56,21	5,11		
		2,56	8,20	4,96	55,87	57,63	61,57	54,76	5,29	4,88	±0,36
		11,49	10,15	1,94	29,25	29,74	30,66	27,65	4,65		
		3,83	3,48	0,68	29,25	30,28	31,42	28,10	4,63		
		6,91	6,83	1,38	29,25	31,71	32,76	28,77	4,97		
		8,45	7,72	1,71	29,25	31,15	31,35	30,59	4,20		

mais lors de dilutions isotopiques d'une molécule comportant un atome d'azote par un autre comportant un atome d'azote engagé dans une liaison d'énergie différente. La force de liaison des atomes d'azote de chaque molécule était différente.

Nous avons volontairement cherché à produire un déséquilibre gazeux isotopique, en diminuant la température de combustion et en limitant sa durée de cuisson à $2h\frac{1}{2}$.

Le tableau 39 donne les caractéristiques et les résultats de cette opération.

On constate premièrement que la valeur de Q ne change pas. Deuxièmement, lors du dosage d'actébral à 99 % par NH_4Cl à 0,366% de ^{15}N , l'azote de l'actébral est libéré en plus grande quantité que celui de NH_4Cl .

Avec la méthode de Dumas modifiée, l'azote total de deux composés est libéré.

Lors de l'expérience avec de l'actébral plus du KNO_3 , il semble que, soit KNO_3 a été libéré préférentiellement, ce qui est peu probable, soit qu'il y a eu dilution accidentelle de l'échantillon.

L'azote de l'acide nicotinique est libéré préférentiellement, tandis que l'azote de l'actébral n'est pas totalement libéré.

La valeur de Q reste constante et ne fournit aucune indication quant à la combustion totale de l'azote d'un échantillon, car l'équilibre gazeux isotopique est réalisé.

Discussion

La valeur de 4,88 pour Q correspond à la technique propre de mesure de ^{15}N de la spectrométrie d'émission. Une variation importante de cette valeur n'est pas constatée en tant que contrôle de l'équilibre gazeux d'une dilution isotopique. Aussi lors d'un dosage d'azote, faut-il préalablement s'assurer que la molécule de dilution subit une combustion complète.

Pour plus de sûreté, il faut pour une dilution isotopique utiliser des molécules identiques, car le problème du non équilibre de deux atomes d'azote d'origine structurale différente ne se pose pas.

Tableau 39

Constante d'équilibre isotopique de mélanges hétérogènes d'atomes d'azote mesurée par spectrométrie d'émission

Substances	Prép.	Température	I ₂₈	I ₂₉	I ₃₀	% 15N théorique	% 15N déterminé selon équation			Q	Q moy	σ
							1	2	3			
Actébral 99% + NH ₄ Cl 0,366	Dumas	500°C	3,20	14,90	12,28	45,79	64,94	69,97	62,24	5,65		
			4,70	15,20	9,80	45,79	58,58	61,80	56,32	5,01		
			7,90	12,80	4,50	16,78	43,25	44,76	41,28	4,61		
			10,55	14,78	4,55	16,78	39,95	47,20	38,10	4,55		
Actébral 99% + KNO ₃ 0,366	Dumas modif.	"	11,35	10,50	1,88	30,02	30,04	30,87	26,37	5,16	4,92	±0,43
			10,63	9,60	1,89	30,02	30,24	31,09	28,25	4,59		
			11,25	8,90	1,50	35,65	27,48	28,34	25,21	4,69		
Ac. nicotinique 0,366 + NH ₄ Cl 0,366	Dumas modif.	470°C	5,40	3,98	0,65	35,65	26,32	26,92	23,62	4,51	4,34	±0,36
			6,18	4,20	0,42	35,65	23,33	26,37	16,66	3,84		
			7,85	4,52	0,60	35,65	22,05	22,35	20,98	4,33		
Ac. nicotinique 0,366 + NaNO ₃ 0,366	Dumas modif.	500 °C	6,90	4,07	0,50	43,95	22,10	22,48	19,72	4,80	5,24	±0,63
		470 °C	14,75	8,20	0,80	16,85	20,63	21,75	16,32	5,69		

TROISIEME PARTIE

III. APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE D'EMISSION AU METABOLISME D'UN MEDICAMENT

Pour appliquer la spectrométrie d'émission au métabolisme d'un médicament, nous avons choisi le phénobarbital- ^{15}N . Cette molécule offre une très bonne libération de ses atomes d'azote lors de la combustion de Dumas modifiée. Nous l'avons étudiée en milieu biologique, chez le rat. Afin de vérifier et de comparer la précision des mesures d'azote du phénobarbital- ^{15}N , nous avons utilisé simultanément du phénobarbital- ^{14}C .

III.1. Synthèse du phénobarbital- ^{14}C

Nous avons synthétisé le phénobarbital- ^{14}C à partir de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ selon les voies de réactions présentées dans le tableau 40. La synthèse se divise en deux étapes, la première étant la synthèse de l'urée ^{14}C et la seconde la synthèse du phénobarbital- ^{14}C .

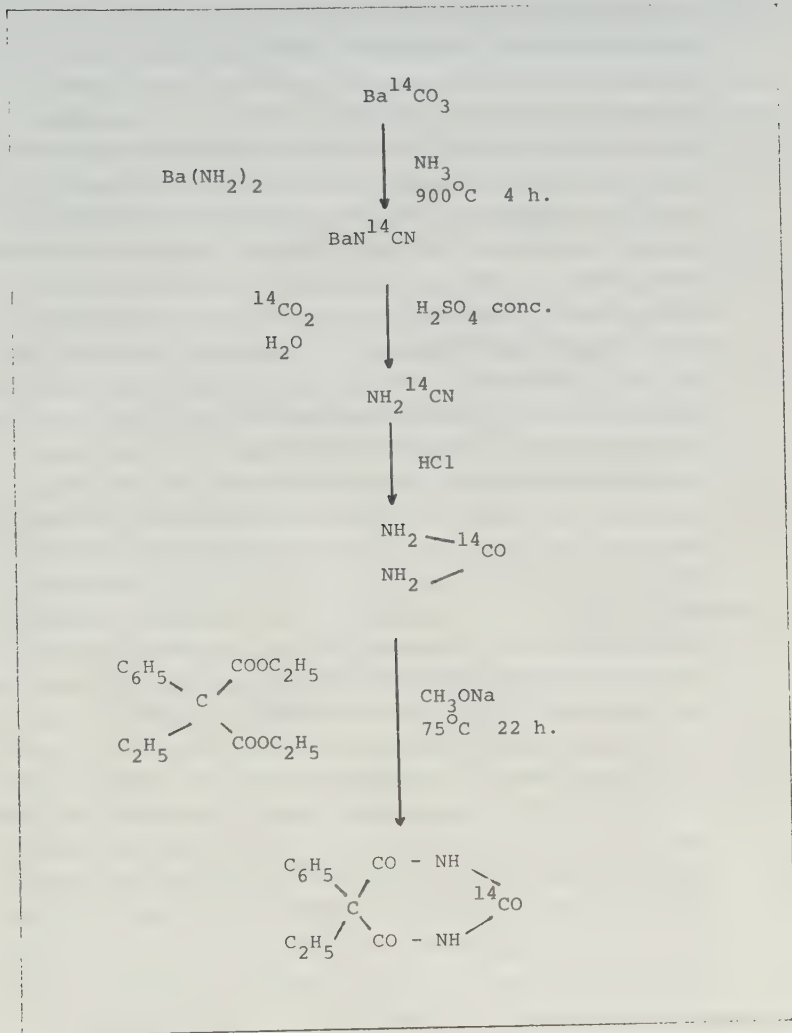
1. Synthèse du l'urée ^{14}C

La première étape est la synthèse de l'urée. Nous avons appliqué la méthode de S.H. Zbarsky et J. Fischer (78) en modifiant la technique.

3 g de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ (50 mC) sont placés dans une nacelle en quartz, en forme de barque couverte pour éviter des projections d'ébullition de solide. Cette nacelle est mise dans le tube à combustion en quartz d'un four électrique, qui est soumis à un courant continu d' NH_3 . Préalablement ce gaz est lavé de son monoxyde et dioxyde de carbone par passage sur de la chaux sodée placée dans un réfrigérant, puis deshydraté sur NaOH en pastilles.

La température du four est maintenue à 900°C durant les quatre heures que dure la réaction. L'ammoniac sortant en continu passe sur NaOH en pastilles puis dans une solution concentrée de KOH afin de capter $^{14}\text{CO}_2$, puis lavé dans 10 litres d' H_2O au rythme d'une bulle par seconde. Le courant

Tableau 40
Synthèse du phénobarbital ^{14}C -2 à partir de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$



de NH_3 est arrêté lorsque la température du four a atteint la température ambiante. La nacelle contenant BaN^{14}CN est introduite et brisée dans un ballon muni à 90° d'une sortie avec filtre. 10 ml de H_2O sont ajoutés et la solution est homogénéisée par un agitateur magnétique durant 30 minutes; 0,8 ml de H_2SO_4 concentré Merck purissim, sont alors ajoutés goutte à goutte (quantité d'acide équivalente au Ba présent); le ballon est muni pour cette opération qui libère $^{14}\text{CO}_2$ d'un reflux relié à un piège contenant du KOH en pastille. On agite le ballon durant 10 minutes, et on rajoute 0,1 ml de H_2SO_4 concentré purissim. Après 10 autres minutes d'agitation, le pH remonte à 9. On ajoute alors HCl jusqu'à un pH acide. On continue l'agitation durant 1 heure. Le mélange est filtré sur filtre D_4 Iena en tournant le ballon de 90° et en tirant sous vide. Le filtrat est recueilli dans un ballon semblable au premier. On lave $\text{NH}_2^{14}\text{CN}$ obtenu avec 40 ml d' H_2O . On ajoute 7,5 ml HCl et on chauffe à reflux durant 30 minutes. On neutralise avec NaOH à 80 % purissim. Merck jusqu'au pH 7. On évapore lentement à sec. Les vapeurs sont aspirées sous vide en passant par un piège de pastilles de KOH. Puis on ajoute 25 ml d'éthanol, on chauffe à ébullition avec reflux relié à un piège de pastilles de KOH et on filtre à chaud sur filtre D_4 Iena par rotation du ballon de 90° . On répète deux fois cette dernière opération. Le filtrat est recueilli sous vide dans un tube, évaporé sous vide et séché avec une pipe de P_2O_5 . La pipe est renouvelée deux fois à 24 heures d'intervalle. Le tube contenant l'évaporat est brisé dans la capsule d'un Soxhlet liquide-solide et l'extraction s'effectue pendant trois heures avec de l'acétone Merck Uvasol. L'acétone est ensuite évaporé et on obtient l'urée $(\text{NH}_2)_2^{14}\text{CO}$, qui est séchée sur P_2O_5 . Toutes ces opérations sont naturellement effectuées dans une boîte à gants reliée à une forte ventilation extérieure et munie d'une circulation d'eau et de pompe à vide. Le rendement de l'urée ^{14}C obtenu est de 65 %.

2. Synthèse du phénobarbital- ^{14}C

Nous effectuons la synthèse du phénobarbital par condensation

de l'urée et de l'éthyl-phényl-malonate d'éthyle en utilisant une technique similaire à Benakis (79), mais sans éthyl-phényl-malonate d'éthyle en excès. Nous utilisons des quantités stoechiométriques de réactifs. Dans un tube, on place 1,364 g d'éthylphénylmalonate d'éthyle, soit 1,273 ml et on ajoute 0,31 g d'urée ^{14}C , solubilisée dans le méthanolate de Na. La solution de méthalonate de Na est préparée en introduisant dans un ballon de 25 ml surmonté d'un tube de refroidissement, 10 ml d'alcool méthylique spécialement déshydraté sur Mg et 0,25 g de Na. Préalablement, le Na est "lavé" dans CH_3OH . Après refroidissement, on introduit la solution de CH_3ONa dans le ballon contenant l'urée, puis celle-ci solubilisée par CH_3ONa , est versée dans le tube contenant éthyl-phényl-malonate d'éthyle. Toutes ces opérations s'effectuent dans le caisson sous atmosphère d'azote. Le tube utilisé est surmonté d'un tube de garde de CaCl_2 et fermé à la flamme au niveau d'un étranglement prévu dans ce but. Il est alors placé dans une étuve et chauffé à 75°C pendant 22 heures. Après refroidissement, on ouvre le tube et l'alcool méthylique est distillé sous vide. On ajoute alors 8 ml d'eau glacée et on extrait à deux reprises avec 3 et 2 ml de benzène. Cette extraction s'effectue par pipetage sous vide.

Après extraction, on acidifie par 0,8 ml d'acide acétique glacial, on transfère dans un extracteur en continu et on extrait à l'éther pendant 4 heures. L'éther est éliminé par distillation. Le résidu est repris par 2,5 ml d'alcool éthylique et le phénobarbital- ^{14}C -2 est précipité en ajoutant de l'eau. Le produit cristallise en chambre froide. Le rendement de l'opération est de 15 %.

La préparation de CH_3OH "extra-sec" a été effectuée selon la méthode préconisée dans Practical Organic Chemistry (80).

Spécifications du phénobarbital- ^{14}C -2

Le phénobarbital- ^{14}C -2 a une activité spécifique de 3,66 $\mu\text{Ci/mg}$. Sa pureté radiochimique a été déterminée par chromatographie

sur papier et sur couche mince. Elle est de 98,7 %.

La stabilité de phénobarbital- ^{14}C est vérifiée par des contrôles réguliers. Nous n'observons pas de radiolyse, si nous conservons le produit solide à température ambiante.

Le poids moléculaire du phénobarbital est de 232,24. Son point de fusion est 174°C . Il est soluble dans l'éther et l'acétone et insoluble dans l'eau.

III.2. Techniques de mesure de la radioactivité du carbone ^{14}C

1. Localisation de substances radioactives séparées par chromatographie sur couche mince

Les produits radioactifs séparés par chromatographie sur plaque sont localisés par autoradiographie.

Les films utilisés sont des Royal Blue Kodak. La durée de mise en contact varie en fonction de la quantité de produits radioactifs.

Les films sont développés avec le révélateur Kodak DX-80 et fixés avec le fixateur Kodak F 40-X Ray.

Les produits radioactifs donnent des taches noires sur un fond bleuté.

2. Compteur Geiger Müller, sans fenêtre

Cet appareil nous permet l'enregistrement de la radioactivité des chromatogrammes sur papier. Son rendement est de l'ordre de 10 % ce qui permet de détecter des activités de 1000 dpm. Le "gaz coupeur" est un mélange argon-éthanol.

3. Spectromètre à scintillation liquide

Nous avons utilisé un spectromètre Beckman CPM 200 B. La radioactivité mesurée est exprimée en coups par minute.

Si la substance n'est pas un agent de quenching, le rendement de l'appareil est d'environ 90 %. Cela nous permet de

calculer nos résultats en désintégration par minute (DPM).

4. Préparation des échantillons pour la mesure de radioactivité

a. solution d'extraction

Un aliquot de 0,1 ml d'extrait mesuré avec une microcaps * est déposé dans un flacon à scintillation avec 10 ml de mélange scintillant. Les échantillons sont comptés dans le spectromètre Beckmann.

III.3. Techniques chromatographiques

1. La chromatographie en couche mince a permis de vérifier la pureté du phénobarbital radioactif, de séparer le phénobarbital après extraction des organes et de l'identifier par comparaison avec son produit de référence.

Nous avons utilisé comme support le gel de silice sur plaque de verre. Les plaques de gel de silice F 254 Merck d'une épaisseur de 0,25 mm avaient les dimensions 20 x 20 cm, ou 5 x 20 cm. Elles sont imprégnées de fluoresceine. Le produit était déposé à 2,5 cm de l'extrémité inférieure de la plaque soumise à une chromatographie ascendante. Une couche de solvant d'environ 1 cm de hauteur était placée au fond de la cuve de verre.

Les solvants utilisés pour la chromatographie sur couche mince sont présentés dans le Tableau 41.

* Drummond Scientific Company USA

Tableau 41

Solvants utilisés pour la chromatographie sur couche mince du
Phénobarbital

Système	Composition	v:v	du phénobarbital	Durée de migration à 24 °C
T ₁₀	Acétone/CHCl ₃	1/9	0,24	2½
T ₁₁	CH ₃ COOH glacial/benzène	1/9	0,37	1½
T ₁₂	NH ₃ conc/benzène/dioxane	5/75/20	0,26	2
T ₁₃	CHCl ₃ /Acétone	8/2	0,42	1½
A/B	Acétonitrile/benzène	1/2	0,5	1½
T ₁₅	Isopropanol/CHCl ₃ /NH ₃	25/25/5	0,38	2½

Lorsque la radioactivité d'un chromatogramme sur couche mince est trop faible pour impressionner un film en un temps assez court, on gratte la silice par secteur de 1 cm de large sur 0,5 cm de haut dans le sens de la migration. Ces secteurs sont placés individuellement dans les flacons et comptés en scintillation liquide. Le résultat peut être obtenu sur bande perforée. Un ordinateur Wang 600 restitue le chromatogramme.

2. La chromatographie sur papier. Le papier utilisé en chromatographie est de la qualité Whatman 1 (46 x 3,5 cm). La distance de migration est de 35 cm. La chromatographie descendante se développe dans un local à 24°C et 70 % d'humidité.

Une radioactivité minimum de 10.000 dpm est nécessaire pour localiser les secteurs radioactifs du chromatogramme à l'aide du compteur Geiger-Müller.

Le Tableau 42 donne les solvants utilisés en chromatographie sur papier

Tableau 42

Système	Composition	v/v	Rf du phénobarbital	Durée de migration
C ₁	n butanol/CH ₃ OH/H ₂ O	9/1/10	0,89	14 h.
C ₄	CH ₃ Cl/CH ₃ OH/H ₂ O/ac. formique	5/1,5/ 3/1	0,38	16 h.

III.4. Techniques d'extraction

Pour extraire le phénobarbital à partir du sérum ou d'un organe, nous nous sommes inspirés d'une technique préconisée par O.V. Olesen (81). Il s'agit d'une méthode d'isolation et de détermination quantitative du phénobarbital en présence d'autres barbiturates.

Mode opératoire

Plasma : à 3 ml de plasma citraté (3,64 g citrate trisodique à 100 cc H₂O) et non hépariné, car la molécule d'héparine comporte 1 atome d'azote (lors d'extraction phénobarbital-¹⁵N), on ajoute 0,1 ml HCl conc. On agite vigoureusement durant 30 secondes avec 85 ml de CHCl₃; on ajoute encore 10 g de sulfate de sodium anhydre (Merck purissim.) et on l'agite 30 secondes. On filtre sur filtre D₄ Iena en lavant deux fois avec du CHCl₃. Le filtrat est évaporé à sec, puis repris avec 3 ml CH₃OH chaud. Après refroidissement, on transfère dans un autre ballon, on évapore à nouveau à sec et on reprend avec CHCl₃.

Organes : les organes sont séchés sous vide et sur P₂O₅ et finement broyés. On applique alors le même mode opératoire que ci-dessus.

L'extrait obtenu est chromatographié sur couche mince dans le système $\text{CHCl}_3/\text{acétone } 8/2$, pour séparer le phénobarbital des autres substances. Le phénobarbital est repéré par autoradiographie ou par UV à 254 nm (Figure 29). On gratte la couche de gel de silice et on filtre sur filtre D_4 Iena avec de l'acétone (Merck Uvasol). On remet sur plaque et on répète cette opération.

Essais et rendement d'extraction

Nous avons déterminé le rendement d'extraction au moyen de cinq essais. Nous avons placé 30 μl de phénobarbital- ^{14}C (activité spécifique 3,61 $\mu\text{Ci/mg}$), soit 247.777 cpm dans un ballon, 3 ml de plasma de rat ou de l'eau, puis 300 μg de phénobarbital inactif ont été ajoutés. Après la procédure d'extraction, on a mesuré la radioactivité en scintillation liquide.

Après mise de l'extrait sur plaque de silica-gel, migration dans le système T_{13} , grattage du silica-gel (15 cm x 2 cm) filtration sur D_4 avec de l'acétone (Uvasol Merck) et répétition de cette opération, le rendement total d'extraction et purification du produit sur plaque est de 51,4 %.

III.5. Synthèse du phénobarbital marqué à l'azote 15

Nous avons synthétisé le phénobarbital marqué à l'azote 15 par condensation de l'urée marquée (99,9 % ^{15}N produit ONIA Toulouse) avec l'éthylphénylmalonate d'éthyle (Merck). Les deux atomes de l'urée sont marqués. La procédure est la même que celle suivie pour la synthèse du phénobarbital- ^{14}C . Le rendement de la synthèse a été de 14,9 %.

Spécifications du phénobarbital doublement marqué à l'azote 15

L'abondance isotopique a été déterminée par spectrométrie de masse (figure 30) et par spectrométrie d'émission. Elle est de 99 % ^{15}N .



Figure 29
Séparation du phénobarbital- ^{14}C et ^{15}N par chromatographie
sur couche mince. Autoradiographie du phénobarbital- ^{14}C du
cerveau du rat 1

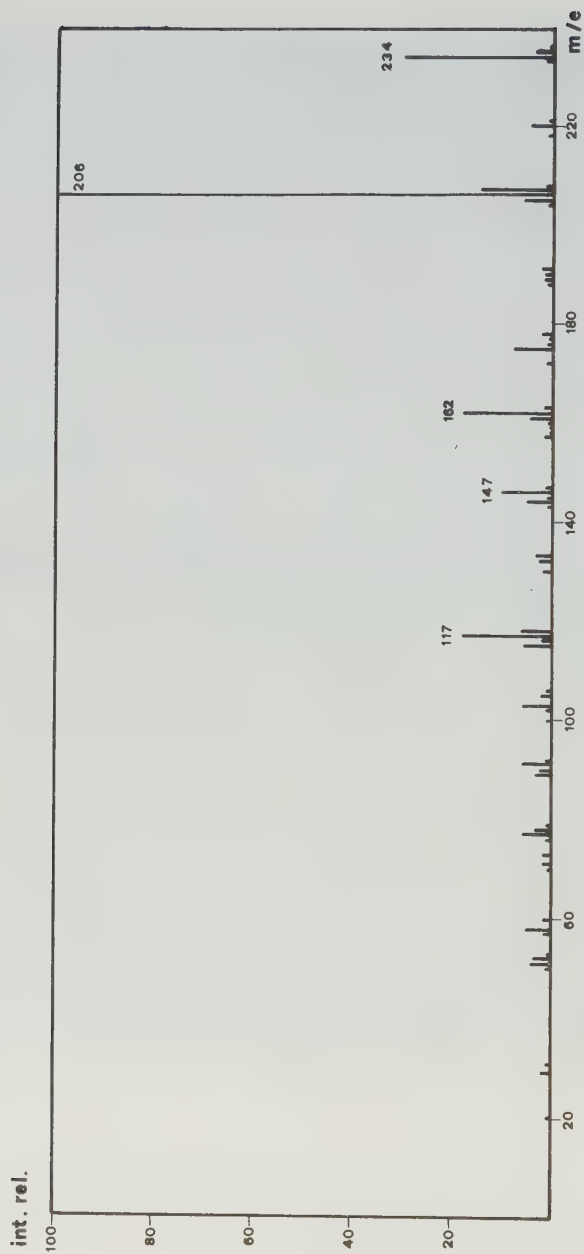


Figure 30
Spectre de masse du phénobarbital- ^{15}N (70 V)

III.6. Essais d'isolement du phénobarbital par chromatographie

III.6.1. Essais d'élution du phénobarbital- ^{15}N après chromatographie sur papier

Un spot de 20 μg de phénobarbital- ^{15}N à 99 % a été soumis à migration sur papier Whatmann No 1. Ensuite dans le tube à décharge, il a été élué par le système C_1 et évaporé à sec à 40°C dans l'étuve.

Le tableau 43 donne le pourcentage d'azote mesuré après chromatographie et élution sur papier.

Tableau 43

Chromatographie sur papier Whatmann de phénobarbital ^{15}N 99 % et élution. Pourcentages ^{15}N retrouvés.

Echantillon	% ^{15}N théorique	% ^{15}N retrouvé	ml d'éluant
1	99	50,47	1,5
2	99	6,16	3,0
3	99	20,26	2,0
4	99	0,86	4,0
5	99	0,53	4,0
6	99	18,58	2,5

L'abondance isotopique diminue, après élution sur papier, en fonction de la quantité d'éluant. Il est possible que le papier contienne des substances azotées.

III.6.2. Essais de mesure de ^{15}N fixé sur du silica-gel

20 μg N d'actébral ont été placés sur silica-gel. Ce dernier a été gratté et mis directement dans le tube pour une combus-

tion de Dumas modifiée. La surface de silica-gel soumise à combustion et % ^{15}N mesuré sont donnés dans le tableau 44.

Tableau 44

% ^{15}N théorique	Surface de silica-gel soumise à combustion cm ²	% ^{15}N retrouvé
99	1,20	85,27
99	0,95	90,79
99	0,90	93,95

On constate que la dilution est fonction de la surface de silica-gel.

Une autre expérience avec du phénobarbital a été effectuée : 20 échantillons de 20 μg de phénobarbital- ^{15}N ont été chromatographiés dans le système CHCl_3 /acétone 8/2 sur plaque silica-gel F254 Merck. Les spots repérés par UV ont été grattés sur une surface de 1 cm², et le gel de silice est placé dans le tube à décharge.

15 échantillons n'ont pas été luminescents. Il semble que SiO_2 empêche une bonne combustion de Dumas, ou qu'il contient des substances libérant des gaz indésirables. Les 5 échantillons luminescents présentaient une abondance isotopique d'azote diminuée d'environ 40 %.

III.6.3. Essais d'élution du phénobarbital- ^{15}N à partir de plaque de silica-gel F 254. Grattage du silica-gel et élution de la substance par filtration

5 échantillons de 20 μg de phénobarbital- ^{15}N à 50,18 % ont été chromatographiés sur plaque CCM silica-gel F 254 dans le système CHCl_3 /acétone 8/2. Les spots repérés par UV ont été

grattés sur une surface de 1 cm². Le silicagel a été élué par filtration sur filtre D₄ avec de l'acétone (Uvasol Merck). Le filtrat placé dans le tube à décharge est évaporé dans l'étuve. Après combustion de Dumas, on a obtenu les résultats présentés dans le Tableau 45.

Tableau 45

Elution de phénobarbital ¹⁵N 50, 18% après CCM et grattage du silica-gel et élution de la substance par filtration.

Echantillon	% ¹⁵ N théorique	% ¹⁵ N retrouvé
1	50,18	43,3
2	50,18	44,3
3	50,18	47,6
4	50,18	47,8
5	50,18	48,2

IV. Expériences chez le rat

IV.1. Conditions d'administration et d'expérimentation du phénobarbital chez le rat

Nos expériences sont conduites sur des rats Wistar* mâles adultes de 120 g environ. Une dose de l'ordre de 80 mg/kg de phénobarbital est administrée par injection intrapéritonéale : 10 % de la dose est sous forme de phénobarbital-¹⁴C et 90 % sous forme de phénobarbital-¹⁵N.

La solution d'injection de phénobarbital est préparée ainsi :

* Institut de Zootechnie, Zürich

on dissout le phénobarbital dans NaOH 4N, puis on ajoute du sérum physiologique. Le pH est alors ajusté à 7,3 environ avec HCl.

Les conditions d'administration par voie i.p. du phénobarbital ^{15}N - ^{14}C chez les rats sont données dans le tableau 46.

Tableau 46
Conditions d'administration par voie i.p. du phénobarbital ^{15}N - ^{14}C
chez les rats Wistar mâles

No animal	Poids animal [g]	Sacrifié h. après adm.	Dose adm [mg/kg]	Quantité phéno ^{14}C adm. [mg]	μCi adm.	Quantité ^{15}N adm. [mg]	Enrichissement ^{15}N adm.
1	168	1	90,02	1,64	5,92	13,47	88,61
2	128	1	91,79	2,36	8,52	9,39	79,40
3	122,5	3	76,73	0,83	3,02	8,56	90,66
4	119	3	75,94	0,89	3,22	8,14	89,58

Durant l'expérience, les rats sont maintenus dans une cage d'élevage et s'alimentent à volonté.

A la fin de l'expérience, les animaux sont chloroformés et sacrifiés par ponction cardiaque.

Le plasma est séparé des éléments figurés du sang par centrifugation à 2000 t/min. durant 10 minutes. Les principaux organes sont prélevés dans un ordre établi d'après leur disposition anatomique : foie, estomac, reins, intestin grêle, gros intestin, coeur, poumons et cerveau.

Les différents organes sont isolés au bistouri et pesés à l'état frais.

Ils sont placés dans un dessiccateur avec P_2O_5 et séchés durant 4 à 5 jours.

Les organes sont alors réduits en poudre dans un mortier et

le phénobarbital est extrait selon la technique décrite dans le paragraphe III.4.

IV.2. Mode opératoire du dosage d'azote en milieu biologique

Le phénobarbital- ^{15}N extrait est solubilisé dans 1 ml de CH_3OH . 0,1 à 0,3 ml de cette solution d'extraction sont placés dans un tube à décharge afin d'en déterminer l'abondance isotopique.

Des aliquots de 0,1; 0,07; 0,05; 0,04; 0,03; 0,025 ml de la solution d'extraction sont réservés à la dilution isotopique. A ces aliquots sont ajoutés 0,825 ou 1,65 ou 2,745 μg d'azote sous forme de phénobarbital à 0,366 % ^{15}N en vue d'effectuer le dosage de l'azote par dilution isotopique. La solution des aliquots placée dans les tubes à décharge est évaporée à l'étuve. Le dispositif *d* de la rampe à vide (voir paragraphe II.2.4.) est utilisé. Nous scellons donc simultanément le tube à décharge de détermination de l'abondance isotopique d'extraction et trois tubes à décharge de dosage par dilution isotopique inverse.

Les solutions de phénobarbital- ^{15}N enrichies et de phénobarbital à 0,366 % sont placés au fond des tubes à décharge. Le catalyseur de combustion est placé dans la première section du tube à décharge (avant l'étranglement médian) tenu horizontalement. La substance et le catalyseur de combustion ne sont de cette manière pas mélangés. On peut ainsi dégazer le catalyseur sous vide par chauffage au chalumeau, sans risque de sublimer ou de décomposer la substance organique. Les tubes restent placés sous vide durant 35 à 45 minutes au moins avant d'être scellés.

IV.2.1. Dosage d'azote par double dilution isotopique inverse

La double dilution isotopique inverse permet de doser l'azote ou un produit azoté, non entièrement purs, isolés par extraction d'un milieu biologique.

C'est l'un de ses grands avantages.

Ainsi, connaissant l'enrichissement initial élevé E_o du produit injecté à un animal, on peut déterminer la quantité d'azote ou du produit m extrait du plasma ou des organes.

Nous procédons de la manière suivante :

1. nous déterminons sur un aliquot l'enrichissement de la solution d'extraction E'' .
2. nous dosons l'azote U d'un aliquot de la solution d'extraction par dilution isotopique inverse. Nous ajoutons donc une quantité m' connue à enrichissement E connu et nous mesurons l'enrichissement E' de dilution. Nous avons

$$U = \frac{m' \cdot E'}{E'' - E'} \cdot \frac{M_1 + \frac{E''}{100}}{M_1} \quad (1)$$

U est égal à la quantité d'azote m enrichie à E_o + la quantité d'azote naturel y de dilution. Nous pouvons donc poser que

$$y = U - m$$

et

nous admettons de la substance m enrichie E_o a subi une dilution isotopique inverse d'où nous pouvons poser

$$\frac{(U - m) \cdot E'}{E_o - E'} \cdot \frac{M_1 + \frac{E_o}{100}}{M_1} = m \quad (2)$$

En résolvant les équations 1 et 2 on trouve la valeur de m

$$m = \frac{\frac{m' \cdot E'}{E'' - E'} \cdot \frac{M_1 + \frac{E''}{100}}{M_1} \cdot E'' \cdot \frac{M_1 + \frac{E_o}{100}}{M_1}}{E_o - E'' + E'' \cdot \frac{M_1 + \frac{E_o}{100}}{M_1}}$$

où

m : quantité d'azote ou de produit extrait

E_o : enrichissement de la quantité d'azote m

E" : enrichissement de la solution extraite

m' : quantité de substance de dilution lors du dosage d'azote

E' : enrichissement de l'azote dilué par m'

M₁ : poids moléculaire de l'azote ou du produit azoté

V. Résultats

Le phénobarbital a été administré doublement marqué ^{14}C et ^{15}N . Son taux plasmatique et celui de huit des principaux organes du rat ont été déterminés par dilution isotopique radioactive et par double dilution isotopique inverse de ^{15}N . Les mesures par radioactivité, par rapport aux mesures d'un pourcentage d'un isotope stable, offrent une meilleure précision. Aussi nous comparons les valeurs obtenues par radioactivité à celles obtenues à l'aide de ^{15}N .

V.1. Taux plasmatique du phénobarbital chez le rat

Dosage plasmatique de l'azote du phénobarbital- ^{15}N

Dans le tableau 47, la méthode de libération de l'azote, les conditions de la dilution isotopique inverse, c'est-à-dire la substance azotée de dilution, l'abondance isotopique de l'extraction, la quantité d'extrait prélevé pour une mesure à partir d'une solution d'extrait de 0,2 ml, la substance de dilution, l'abondance isotopique de la dilution, enfin les $\mu\text{g N}$ dosés sont indiqués.

Taux plasmatique du phénobarbital- ^{15}N et - ^{14}C chez le rat

Dans le tableau 48, le temps de sacrifice des rats après administration du produit, le taux plasmatique du phénobarbital dosé par radioactivité et par l'isotope stable ^{15}N , enfin le taux plasmatique ramené à une injection unitaire de 80 mg/kg sont indiqués.

Tableau 47

Dosage de l'azote du phénobarbital- ^{15}N du plasma chez le rat

Animal No	Méthode de combustion	Abondance iso- topique d'ex- traction (% ^{15}N)	Quantité d'extrait dosé (ml)	Substance de dilution			Abondance isotopique après di- lution, (% ^{15}N)	$\mu\text{g N}$ dosé
				Quantité (μg)	nature	Abondance isotopique (% ^{15}N)		
1	Dumas mod.	76,30	0,5	4,026	NH_4Cl	17,70	57,83	7,90
2	Dumas mod.	68,39	0,4	12,07	NH_4Cl	17,70	33,32	4,84
			0,2	16,09			24,50	2,24
3	Dumas mod.	79,18	0,4	8,05	NH_4Cl	17,70	43,25	5,25
4	Dumas mod. avec gaz rares	68,17	0,07	1,65	phénob.	0,366	25,60	0,78

Tableau 48

Taux plasmatique du phénobarbital ^{15}N et ^{14}C chez le rat

Animal	Temps de sacrifice h	Taux plasmatique du phénobarbital (μg)				Taux plasmatique du phénobar- bital après injection unitaire de 80 mg/kg ($\mu\text{g/ml}$)			
		^{14}C	^{15}N	moy	σ	^{14}C	^{15}N	moy	σ
1	1	125	124	124,5	0,71	111	110	95,80	16,60
2	1	115	94 87	98,66	14,57	100	82 76		
3	3	104	102	103	1,41	109	107	103,00	7,11
4	3	98	88	93	7,07	103	93		

V.2. Taux du phénobarbital de huit des principaux organes du rat

Nos résultats sont rassemblés dans des tableaux qui montrent la valeur, pour chaque organe du rat, de l'abondance isotopique de l'azote extrait, de la quantité d'extrait soumis à la dilution isotopique (à partir d'une solution de 1 ml CH_3OH), de la quantité d'azote de dilution en μg , de l'abondance isotopique des échantillons, enfin de la quantité mesurée, en μg d'azote, de la prise, et de la quantité de μg d'azote extrait. Les tableaux 49, 50, 51 et 52 concernent les rats 1, 2, 3 et 4 respectivement. Ils concernent le dosage par ^{15}N . Le tableau 53 concerne le dosage de l'azote par la radioactivité.

V.3. Comparaison des dosages d'azote par dilution isotopique radioactive et par dilution isotopique de l'azote ^{15}N

Le tableau 54 concerne les rats 1 et 2 sacrifiés 1 heure après administration i.p. de phénobarbital ^{15}N - ^{14}C .

Le tableau 55 concerne les rats 3 et 4 sacrifiés 3 heures après administration i.p. de phénobarbital ^{15}N - ^{14}C .

Tableau 49
Conditions de mesure et taux d'azote (du phénobarbital ¹⁵N) extrait de huit des principaux organes du rat 1

Organes	% ¹⁵ N extrait	Quantité de subst. mesurée (ml)	Quantité de subst. de dilution (µg)	% ¹⁵ N après dilution			µg N déterminé	µg N extrait
				Ech. 1	Ech. 2	moyenne		
*Foie	55,71	0,10	12,37	14,42	13,03	13,72	5,99	59,93
Reins	21,33	0,05	2,47	7,95	8,42	8,08	0,37	7,44
Coeur	16,47	0,05	1,65	7,83	6,20	7,01	0,22	4,52
Poumons	12,36	0,05	1,65	6,64	7,04	6,84	0,29	5,92
Cerveau	25,67	0,05	1,64	10,3	11,44	10,87	0,35	7,14
Estomac	24,62	0,05	0,82	15,87	17,20	16,53	0,48	9,64
Intestin grêle	35,28	0,05	0,82	29,02	30,81	29,92	1,91	38,26
*Gros intestin	69,38	0,10	12,37	22,44	-	22,44	4,01	40,09

* méthode de Dumas

Tableau 50
Conditions de mesure et taux d'azote (du phénobarbital ¹⁵N) extrait de huit des principaux
du rat 2

Organes	% ¹⁵ N extrait	Quantité de subst. me- surée (ml)	Quantité de subst. de dilution (µg)	% ¹⁵ N après dilution			µg N déterminé	µg N extrait
				Ech. 1	Ech. 2	moyenne		
Foie	42,55	0,05	0,82	33,60	34,55	34,07	1,84	36,88
Reins	23,10	0,05	2,47	5,85	6,19	6,02	0,25	4,98
Coeur	19,97	0,05	2,47	3,30	4,00	3,65	0,13	2,62
Poumons	25,10	0,05	2,47	5,65	6,05	5,85	0,23	4,66
Cerveau	27,68	0,05	1,65	16,13			0,82	8,22
Estomac	22,30	0,05	0,825	14,75	15,15	14,95	0,48	9,62
Intestin grêle	-	-	-	-	-	-	-	-
Gros intestin	60,05	0,025	0,825	29,08	31,00	30,04	0,65	26,00

Tableau 51
Conditions de mesure et taux d'azote (^{15}N) extrait des huit principaux
organes du rat 3

Organes	% ^{15}N extrait	Quantité de subst. me- surée (ml)	Quantité de subst. de dilution (pg)	% ^{15}N après dilution			pg N déterminé	pg N extrait
				Ech. 1	Ech. 2	moyenne		
Foie	55,31	0,03	0,82	41,41	38,66	40,03	1,11	36,90
Reins	23,77	0,10	1,65	13,57	13,70	13,63	0,59	5,96
Coeur	16,03	0,10	2,47	5,12	6,34	5,74	0,24	2,39
Poumons	28,9	0,10	1,65	14,59	15,10	14,84	0,59	5,90
Cerveau	43,62	0,07	1,65	15,99	15,18	15,58	0,45	6,51
Estomac	56,76	0,04	0,82	40,58	43,21	41,89	1,53	38,32
Intestin grêle	41,79	0,05	1,65	11,13	11,70	11,41	0,29	5,86
Gros intestin	71,37	0,025	0,82	36,5	36,90	36,70	0,72	28,96

Tableau 52

Conditions de mesure et taux d'azote (du phénobarbital ¹⁵N) extrait des huit principaux organes du rat 4

Organes	% ¹⁵ N extrait	Quantité de subst. me- surée (ml)	Quantité de subst. de dilution (µg)	% ¹⁵ N après dilution			µg N déterminé	µg N extrait
				Ech. 1	Ech. 2	moyenne		
Foie	62,52	0,03	0,82	38,75	39,80	39,27	1,02	34,10
Reins	27,70	0,10	1,65	15,48	11,89	13,68	0,51	5,09
Coeur	11,20	0,10	2,47	4,24	4,79	4,52	0,19	1,98
Poumons	57,24	0,05	1,65	12,87	14,09	13,48	0,33	6,70
Cerveau	41,23	0,04	1,65	8,44	9,37	8,90	0,21	5,30
Estomac	49,89	0,04	0,82	15,64	18,67	17,15	0,25	6,26
Intestin grêle	55,06	0,04	0,82	38,08	40,33	39,20	1,32	32,95
Gros intestin	73,15	0,05	0,82	49,20	50,41	49,80	1,49	29,92

Tableau 53
Taux d'azote en μg du phénobarbital ^{14}C extrait de huit des principaux organes du rat

Organes	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4
Foie	58,97	35,13	33,74	36,98
Reins	6,22	4,97	6,33	5,48
Coeur	4,45	3,25	2,84	2,38
Poumons	7,18	4,32	6,25	5,69
Cerveau	6,81	8,50	6,62	5,16
Estomac	9,12	9,11	39,94	7,02
Intestin grêle	34,36	1,40	5,84	32,30
Gros intestin	40,42	26,85	31,16	27,46

Tableau 54

Comparaison des dosages d'azote en milieu biologique par dilution isotopique radioactive et par dilution isotopique de l'isotope stable ^{15}N

<u>Rat 1</u>		
Organe	$\mu\text{g d}'\text{N}$ par radioactivité	$\mu\text{g d}'\text{N}$ par SE
Foie	58,97	59,93
Reins	6,22	7,44
Coeur	4,45	4,52
Poumons	7,18	5,92
Cerveau	6,81	7,14
Estomac	9,12	9,64
Intestin grêle	34,32	38,26
Gros intestin	40,41	40,09
<u>Rat 2</u>		
Foie	35,13	36,88
Reins	4,97	4,98
Coeur	3,25	2,62
Poumons	4,32	4,66
Cerveau	8,50	8,22
Estomac	9,10	9,62
Intestin grêle	1,40	-
Gros intestin	26,88	26,00

Tableau 55

Comparaison des dosages d'azote en milieu biologique par dilution isotopique radioactive et par dilution isotopique de l'isotope stable ^{15}N

<u>Rat 3</u>		
Organe	$\mu\text{g d}'\text{N}$ par radioactivité	$\mu\text{g d}'\text{N}$ par SE
Foie	33,74	36,90
Reins	6,33	5,96
Coeur	2,83	2,39
Poumons	6,25	5,90
Cerveau	6,62	6,51
Estomac	39,94	38,32
Intestin grêle	5,83	5,86
Gros intestin	31,16	28,96
<u>Rat 4</u>		
Foie	36,98	34,10
Reins	5,48	5,09
Coeur	2,38	1,98
Poumons	5,69	6,70
Cerveau	5,16	5,30
Estomac	7,02	6,26
Intestin grêle	32,30	32,95
Gros intestin	27,45	29,92

V.4. % de la dose injectée de phénobarbital par organe chez les rats sacrifiés 1 h et 3 h après administration i.p. du produit

Le tableau 56 montre la valeur en $\mu\text{g/g}$ et en % de dose des rats 1 et 2 sacrifiés 1 h après administration i.p. du phénobarbital ^{15}N - ^{14}C .

Le tableau 57 montre la valeur en $\mu\text{g/g}$ et en % de dose des rats 3 et 4 sacrifiés 3 h. après administration i.p. du phénobarbital ^{15}N - ^{14}C .

Les figures 31 et 32 représentent le % de dose injectée par organe.

V.5. Discussion

Le taux plasmatique du phénobarbital, pour une injection unitaire de 80 mg/kg, est de 95,8 $\mu\text{g/ml}$, 1 heure après injection du produit et 103,0 $\mu\text{g/ml}$, 3 heures après injection du produit. La quantité de produit au niveau du foie est grande. Le tractus gastro-intestinal doit être considéré dans son ensemble; le % de dose injectée est de 9,5 % une heure après injection et de 10,6 % 3 heures après injection.

On constate que la quantité de phénobarbital du foie, des reins et du cerveau et du coeur diminue légèrement entre la première et la troisième heure.

Nous montrons que les résultats obtenus par spectrométrie d'émission concordent avec ceux obtenus par radioactivité.

Tableau 56

µg phénobarbital/g organe pour une injection unitaire de 80 mg/kg et % dose de phénobarbital par organe. Sacrifice des animaux 1 heure après injection i.p.

Organes	Rat 1		Rat 2		µg/g		Rat 1		Rat 2		% dose	
	14 C	15 N	14 C	15 N	moy.	σ	14 C	15 N	14 C	15 N	moy.	σ
Foie	127,19	117,86	88,60	93,01	106,68	18,79	6,73	6,83	4,38	5,28	5,80	1,18
Reins	98,73	118,00	105,17	105,38	106,82	8,06	1,00	1,20	1,04	1,22	1,12	0,11
Coeur	159,27	147,31	133,65	107,56	136,94	22,21	0,75	0,74	0,64	0,58	0,68	0,08
Poumons	110,10	90,71	116,39	125,53	110,68	14,74	1,00	0,83	0,78	0,97	0,89	0,10
Cerveau	115,34	120,94	107,15	103,63	111,78	7,84	1,52	1,47	1,34	1,49	1,45	0,08
Estomac	90,97	96,14	81,59	86,19	87,72	6,25	1,37	1,45	1,49	1,81	1,53	0,19
Intestin grêle	77,37	86,15	4,45	-	55,99	44,85	3,79	4,21	2,00	-	3,33	1,17
Gros intestin	134,26	133,18	60,99	59,05	96,87	42,56	5,84	5,80	3,73	3,29	4,66	1,34

Tableau 57
 µg phénobarbital/g organe pour une injection unitaire de 80 mg/kg et % dose de phénobarbital
 par organe. Sacrifice des animaux 3 heures après injection i.p.

Organes	Rat 3		Rat 4		µg/g		Rat 3		Rat 4		% dose	
	14 _C	15 _N	14 _C	15 _N	moy	σ	14 _C	15 _N	14 _C	15 _N	moy	σ
Foie	132,38	144,76	155,11	143,03	143,82	9,31	4,42	4,84	6,22	5,73	5,30	0,82
Reins	79,71	75,04	71,04	65,96	72,94	5,84	0,83	0,78	0,92	0,85	0,85	0,06
Coeur	81,40	68,63	62,80	52,28	66,28	12,14	0,37	0,32	0,40	0,33	0,36	0,04
Poumons	105,50	99,59	98,09	115,50	104,67	7,89	0,82	0,77	0,95	1,12	0,90	0,17
Cerveau	64,04	62,97	48,85	50,18	56,51	8,11	0,87	0,85	0,87	0,89	0,87	0,02
Estomac	315,69	302,88	47,20	42,13	176,97	152,80	5,24	5,03	1,18	1,05	3,13	2,32
Intestin grêle	23,05	23,14	89,27	91,07	56,63	18,73	0,76	0,77	5,43	5,54	3,13	2,72
Gros intestin	111,23	103,38	87,60	95,47	99,42	10,17	4,08	3,80	4,62	5,03	4,38	0,55

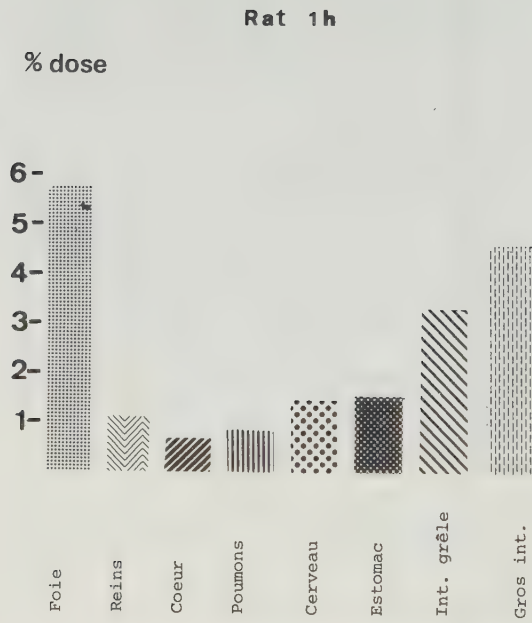


Figure 31

% de la dose injectée de phénobarbital, par organe, chez le rat sacrifié 1 heure après administration i.p. du produit.

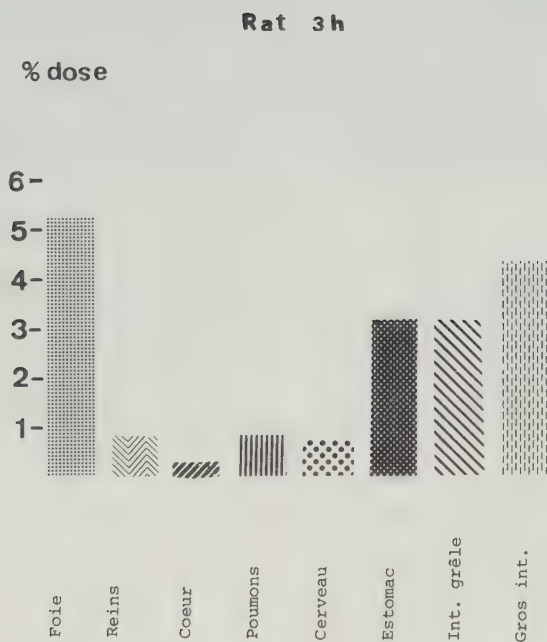


Figure 32

% de la dose injectée de phénobarbital, par organe, chez le rat sacrifié 3 heures après administration i.p. du produit.

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons montré qu'il est possible d'étudier en milieu biologique, chez le rat, la localisation et le taux d'une substance exogène marquée à l'azote 15. L'abondance isotopique de l'azote a été mesurée par spectrométrie d'émission.

Dans une première partie, nous avons expérimenté la reproductibilité du spectromètre d'émission (^{15}N Statron Analyser, Isocommerz Berlin), la préparation des échantillons, ainsi que le dosage de l'azote.

Dans une seconde partie, la spectrométrie d'émission a été appliquée à l'analyse d'un médicament, le phénobarbital- ^{15}N , en milieu biologique.

Nous avons établi les paramètres de travail du spectromètre d'émission; d'une part, nous avons cherché la tension du photomultiplicateur et les amplifications spécifiques des pics pour la détermination d'abondance isotopique d'azote la plus précise. D'autre part nous avons cherché sur quelle base s'effectuait le choix de la hauteur des pics $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ du spectre de l'azote; en effet les publications sur ce sujet ne concordent pas d'un auteur à l'autre.

Nous avons constaté que l'erreur relative des mesures de l'abondance isotopique, comparée à la valeur de standards mesurés par spectrométrie de masse était de l'ordre de 3 % pour des abondances isotopiques entre 5 et 90 % d'azote 15.

Nous avons expérimenté plusieurs techniques pour libérer de l'azote gazeux. Notre but était de mettre au point une méthode pour déterminer l'abondance isotopique de faibles quantités d'azote, de l'ordre du μg . En effet, les molécules des médicaments comportent souvent un seul atome d'azote. Elles ont en général une masse moléculaire d'environ 400. Isoler un produit exogène de cette masse moléculaire à partir du milieu biologique, puis libérer son azote en quantité de l'ordre de dizaines de μg comporte de grandes difficultés.

Nous avons utilisé quatre méthodes :

1. la méthode à NaOBr, qui permet d'obtenir 100 % d'échantillons luminescents, mais nécessite 40 μg d'azote
2. la méthode de Dumas, qui a fourni des résultats médiocres
3. la méthode de Dumas modifiée, où nous utilisons CuO en poudre et en batonnet, CaO en poudre et en granulé, plus du Cu métallique en plaquette de 1mm², le tout en couches superposées. Cette méthode nécessite environ 10 μg d'azote. La luminescence peut être stimulée encore 2 ans après la première excitation.
4. la méthode de Dumas modifiée avec usage de gaz rares. Après des essais avec divers gaz, hélium, argon, hélium+argon, nous utilisons de l'hélium à la pression de 10 Torr et le xénon à la pression de 0,1 à 2 Torr. Nous déterminons par cette méthode une quantité d'azote de l'ordre de 1 μg . Les échantillons sont luminescents à 100 % et la stimulation de la luminescence peut encore être répétée 2 ou 3 semaines après l'émission initiale.

Nous avons dosé l'azote par dilution isotopique directe et inverse de substances identiques ou différentes.

L'erreur relative dans les conditions les meilleures pour la dilution isotopique de substances minérales identiques est de 1,3 % et pour des substances mixtes minérales et organiques, elle est moins précise, 3,6 %.

Le calcul de l'abondance isotopique est basé sur le fait que la constante d'équilibre des isotopes gazeux de l'azote est de 4.

Lorsque l'équilibre n'est pas réalisé, cette valeur est fortement augmentée ou diminuée. Elle peut donc signifier que la combustion d'une molécule comportant deux azotes différemment marqués et engagés dans des liaisons d'énergie différente n'est pas totale. Elle peut indiquer également qu'une dilution isotopique de deux substances différentes n'est pas exacte. Nous avons trouvé une constante égale à 4,89, qui est propre à la spectrométrie d'émission, car la hauteur du pic n'entrant pas dans le calcul de l'abondance isotopique n'est pas proportionnelle à la concentration de la molécule qu'il représente.

Cependant, nous n'avons observé que peu de variations de la valeur 4,89 et pensons que notre catalyseur active une combustion

complète, comme le prouve les mesures de dilution isotopique.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons fait la synthèse du phénobarbital- ^{14}C et ^{15}N , pour comparer la valeur des résultats par dilution de la radioactivité et par dilution de l'isotope stable.

Nous avons dosé le taux plasmatique du phénobarbital- ^{15}N et ^{14}C , ainsi que le taux de huit des principaux organes du rat. Les animaux ont été sacrifiés 1 h et 3 h après administration i.p. du produit.

Le taux sanguin du phénobarbital 1 h et 3 h après administration se situe sur un plateau; il est de l'ordre de 95 $\mu\text{g/ml}$ de plasma.

Le % de dose injectée retrouvé au niveau du foie, des reins, du coeur et du cerveau diminue légèrement entre la première et la troisième heure. La quantité présente dans le tractus gastro-intestinal est de 9,52 % et 10,64 % pour la première et troisième heure respectivement.

Les valeurs obtenues par spectrométrie d'émission comparée aux valeurs obtenues par la mesure de la radioactivité concordent.

La spectrométrie d'émission est donc applicable aux molécules exogènes d'un milieu biologique.

Ce fait est intéressant pour deux raisons :

1. le spectromètre d'émission est un appareil de laboratoire d'un coût modeste comparé au spectromètre de masse
2. l'utilisation d'azote 15 , isotope stable, dans la recherche clinique élimine le problème éthique soulevé par les radiations d'un produit marqué.

BIBLIOGRAPHIE

1. Naude S.M. (1929) An isotope of nitrogen, mass 15. Phys. Rev. 34, 1498 L
2. VAN DYKE H.B. et al. (1947) The excretion of N-15 in the urine of dogs after administration of labelled pentobarbital. J. Pharmacol. Exp. Therap. 90, 364-366.
3. MAYNERT E.W., VAN DYKE H.B. (1950) Absence of localisation of barbitals in division of the central nervous system. J. Pharmacol. Therap. 98, 184-187.
4. MAYNERT E.W., VAN DYKE H.B. (1950) Metabolism of amytal labelled with N-15 in dogs. J. Pharmacol. Exp. Therap. 98, 180-183.
5. MAYNERT E.W., VAN DYKE H.B. (1959) Metabolic fate of pentobarbital dilution experiments with urine after administration of labelled pentobarbital. J. Pharmacol. Exp. Therap. 98, 174-179.
6. RITTENBERG D., KESTON A.S., ROSEBURY F., SCHOENHEIMER R. (1939) Studies in protein metabolism. J. Biol. Chem. 127, 291.
7. BENEDICT J.D., FORSHAM P.H., STETTEN DE WITT Jr (1949) Metabolism of uric in the normal and gouty human studied with aid of isotope uric acid. J. Biol. Chem. 181, 183-193.
8. BENEDICT J.A., ROCHE M., YU T.F., BIEN E.J., BUTMANN A.B., STETTEN DE WITT (1952) Incorporation of glycine nitrogen into uric acid in normal and gouty man, Metabolism 1, 3-12.
9. JAMES G.W., ABBOTT L.D., BROOKS B.W., EVANS E.J. (1954) The anemia of thermal injury. III. Erythro poiesis and hemoglobin metabolism studied with H-15-glycine in dog and man. J. Clin. Invest. 33, 150-162.
10. BOWERING J., CALLOWAY D.H., MARGEN S., KAUFMANN N.A. (1970) Dietary protein level and uric acid metabolism in normal man. J. Nutr. (Philad.) 100 (2), 249-252.
11. RISPELL K.R., PARSON Wm., HOLLOFIELD G., BRENT S. (1956) A study of the rate of protein synthesis before and during the administration of L-triiodothyronine to patients with myxedema, and healthy volunteers, using N-15-glycine. J. Clin. Invest. 35, 164-169.

12. CRANS C.W., NEUBERGER A. (1960) Resorption und Ausscheidung von N-15 nach Verabreichung von markiertem Hefeprotein und Hefeproteinhydrolysat an erwachsene Patienten mit Crohn'sche, 2. Mitt. Isotopenausscheidung in Harn und Faeces. Brit. med. J. II 888-894.
13. CRANE V.C., NEUBERGER A. (1960) Die Verdauung und Resorption von Protein beim normalen Menschen. Biochem. J. 74, 313-323.
14. NICHOLSEN J.F. (1970) Rate of protein synthesis in premature infants. Pediatr. Res. 4(5), 389-397.
15. NICHOLSEN J.F. (1970) Metabolism of ingested ammonium-N-15 by premature infants. Pediatr. Res. 4(5), 389-404.
16. EVANS R.I. (1957) Red-cell survival in familial haemolytic anaemias. Nature (Lond.) 180, 1435-1436.
17. FALLOT P.J., CANIVERT J., MONDET M., POIDATZ J. (1956) Biosynthèse de l'uroporphyrine par les lysats d'hématies humaines. Compte rendu 242, 2668-2670.
18. GILBERTSEN S., CAMPBELL M., WATSON C.J. (1957) Einige Beobachtungen über das unterschiedliche Schicksal des Bilirubins in Abhängigkeit von der Konjugation und andere Faktoren. J. Lab. Clin. Med. 50, 818.
19. RICHTER H., THELEMANN W., FAUST H. (1969) Plasmaprotein- und Fibrinogensynthese aus oral verabreichtem ¹⁴N-Harnstoff bei der Ziege. Arch. Tierern. 19, 321-329.
20. WEISMANN B., BROMBERG P., GUTMAN A. (1957) The purine bases of human urine. II. Semiquantitative estimation and isotope incorporation. J. Biol. Chem. 224, 424-434.
21. CRANE C.W., GAY W.M.B., JENNER P.A. (1969) Urea production from labelled ammonia in argininosuccinic aciduria. Clin. Chim. Acta 24, 445-448.
22. FURST P. (1969) N-15-Studie über die Protein-Synthese in gesunden Normalpersonen und Patienten mit chronischer Urämie. 6. ASTI.
23. READ W.W.C., McLARSEN D.S., TCHALIAN M., NASSAR S. (1969) Studies with nitrogen-15 labelled ammonia and urea in the malnourished child. J.Clin.invest. 48, 1143-1149.
24. BUZARD J.A., BISHOP C., TALBOTT H.J. (1955) The fate of uric in the normal and gouty human being. J. Chronic Diseases 2, 42-49.
25. LEVINTOW L. (1957) Nachweis über glutamin als Vorstufe des Asparagins in einer Gewebekultur menschlicher Zellen. Science, 126, 611-612.

26. SEITCHIK J., SZUTKA A., ALPER C. (1958) Further studies on the metabolism of N-15-labelled uric acid in normal and toxemic pregnant women. *Amer. J. Obstetr. Gynecol.* 76, 1151-1155.
27. AMATUZIO D.S., HAGEN P.S., EVANS R.L. (1956) The incorporation of N-15-labelled glycine in the plasma protein, plasma phospholipids, blood non protein nitrogen, and splenic tissue in man. *J. Lab. Clin. Med.* 47, 241-247.
28. ORAWHALL J.C., WATTS R.W.E. (1958) Free glycine metabolic pool in man. *Biochem. J.* 69, 22-23.
29. HALLAM A., KASSENAAR A.H., QUERIDO A. (1962) Studies of protein metabolism in humans with the aid of N-15-labelled glycins. *Acta Endocrinol. Suppl.* 67, 60.
30. HSIEN Wu, BISHOP C.W. (1959) N-15-Ausscheidung beim Menschen nach Verabreichung von N-15-Glycin. (N-15-Ausscheidung beim Menschen nach Verabreichung von N-15-L-Phenylalanin. Interpretation der N-15-Harnausscheidungsergebnisse nach Verabreichung einer N-15-Aminosäure. *J. appl. Physiol.* 14, 1-21.
31. DAHLGARD M. (1960) Carcinogenic amine derivatives containing nitrogen-15. *J. organ. Chem.* 25, 469.
32. SPRINSON D.B., RITTENBERG D. (1949) The rate of interaction of the amino acids of the diet with the tissue proteins. *J. Biol. Chem.*, 180, 715.
33. SCHØNHEYDER F., CHRISTENSEN P.J. (1957) The mechanism of creatinuria during immobilization in bed. *Scand. J. olim. Lab. invest.* 9, 107-108.
34. TSCHUDY D.P., MARSHALL M., GRAFF A., GRAFF S. (1958) Studies of nitrogen metabolism in human cancer using isotopically labelled L-aspartic acid. *Cancer* 11, 984-995.
35. OLESEN K., HEILSKOV N.C.S., SCHHEYDER F. (1954) The excretion of ¹⁵N in urine after administration of ¹⁵N-glycine. *Biophys. Acta* 15, 95-106.
36. CZARNETZKI H.D., GEBHARDT O., HARTIG W., HUBNER G. und WETZEL K. (1969) Der Eiweißstoffwechsel der Ratte, Untersuchungen mit ¹⁵N-markiertem Glyzin. *Archiv f. Tierern.* 19, 623-629.
37. DIMANT E., LANDBERG E., LONDON I.M. (1955) Die Rolle des reduzierten Glutathione im Stoffwechsel von menschlichen und Vogelerthrocyten. *J. Biol. Chem.* 213, 769-776.

38. EXNER H., GURTLE H., KOLB E., RICHTER H. (1968) Der Einbau von Harnstoff-Stickstoff in die Aminosäuren der Leber und der Blutserumfraktionen nach Verfütterung von ^{15}N -Harnstoff an laktierende Kühe. Wiss. Z.d. Karl-Marx-Univ. Leipzig, 17, 761-767.
39. KOHLER R.U., GEBHARDT G. (1969) Untersuchungen zur Aminosäure-Resoprtionskinetik. Wiss. Z.D. Univ. Rostock, 18, 193-196.
40. SALZMANN N.P., EAGLE H., SEBRING E.D. (1958) Die Verwendung von Glutamin, Glutaminsäure und Ammoniak für die Biosynthese der Nucleinsäureblasen in Zellkulturen von Säugetieren. J. Biol. Chem. 230, 1001-1012.
41. Isotopes Techniques for Studying Animal Protein Production from Non-Protein Nitrogen, Technical reports series No 111, Joint FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture, Vienne 1970.
42. GUTMANN A.B., YU T.P., BLACK R., YALOW A.S., BERSON S.A. (1958) Inkorporierung des C-14-Glycins und des N-15-Glycins in Harnsäure bei normalen und an Gicht erkrankten Patienten. Amer. J. Med. 25, 917-932.
43. PRACHELL M.J., JONES M., PIERCE J.S. (1969) Incorporation of carvon-14 uniformly labelled and nitrogen-15 labelled leucine by exised barley embryos. J. Inst. Brsw. (London) 75, 511-514.
44. SEEGMILLER J.E., LASTER L., STETTON dex WITT Jr. (1955) Incorporation of 4-amino-5-imidazolecarboxamide-4-C-14 into uric acid in the normal human. J. Biol. Chem. 216, 653-662.
45. Handbook of chemistry and physics. 55th éd. CRC Press 1974-1975.
46. Herzberg, Spectra of Diatomic molecules. vol. 1 New York 1955
47. HOCH M., WEISSER H.R. (1950) Helv. Chim. Acta, 33, 2128.
48. BROIDA H.P., CHAPMAN M.W. (1958) Stable nitrogen isotope analysis by optical spectroscopy. Anal. Chem. 30, 2049.
49. FAUST H. (1965) Zur Probenchemie von Stickstoffverbindungen für die emissionsspektrometrische Isotopenanalyse des Stickstoffs. Isopenpraxis, 18, 313.
50. FAUST H. (1967) Probenchemie ^{15}N -markierte Stickstoffverbindungen im Mikro-bis Nanomolbereich für die emissionspektrometrische Isotopenanalyse. Isotopenpraxis, 3, 100-103.

51. FAUST H. (1969) Optical spectroscopy techniques for N-15 assay. I.A.E./FAO Res. Coord. Meeting on recent development in the use of N-15 in Soil-plant studies. Sofia, Bulgaria, 1-5 december 1969.
52. MEIER G. (1962) Spektroskopische Analyse stabiler Isotope. Isotopentechnik, 2, 343-346.
53. MEIER G., MULLER G. (1965) Zur emissionsspektroskopischen Isotopenanalyse des Stickstoffs mit photoelektrischer Registrierung. Isotopenpraxis, 1, 53-62.
54. MULLER G. (1965) Spezielle Methoden der Analyse stabiler Isotope (zusammenfassender Bericht), Kernenergie, 8, 265-283.
55. SEILER N., VERNER G. (1968) Eine einfache apparative Anordnung zur emissionspektroskopischen ^{15}N -Bestimmung im Mikromassstab. Zeitschrift für Analytische Chemie, 243 Band, 169.
56. KRUGER H. (1939) Neber die Aureichung des ^{15}N Isotopes und einige spektroskopische Untersuchungen um ^{15}N . Dissertation der Technischen Hochschule. Berlin 1939.
57. FERRARIS M.M., PROKSCH G. (1972) Calibration methode and instrumentation for optical ^{15}N determinations with electrodeless discharge tubes. Anal. Chim. Acta, 59, 177-185.
58. STEIN T.P. and coll. (1975) The use of optical Emission Spectroscopy for human ^{15}N Tracer Studies. Analytical Biochem., 66 481
59. KEENEY D. and TEDESCO. Sample preparation for and nitrogen analysis by the NOI-4 emission spectroscope. (1973) Analytica Chimica Acta, 65 19-34.
60. MULLER G. (1973) Kurze Originalmitteilungen Beitrag zur Optimierung der emissionspektrometrischen ^{15}N Analyse. Isotopenpraxis 9 jahrgang Heft 10.
61. GOLEB I.A., MIDDELBOE V. (1968) Optical nitrogen-15 analysis of small samples with a mixture of helium and xenon to sustain the discharge in a electrodeless tube. Anal. Chim. Acta, 43, 229-234.
62. LEICKMANN J.P., MIDDELBOE V., PROKSCH G. (1968) Analyse isotopique de l'azote per spectrométrie d'émission. Anal. Chim. Acta, 40, 487.
63. FAUST H. et REINHARDT R. (1975) Zur Verwendung von Molekularsieb als Adsorbens für Nebenprodukte bei der ^{15}N -Probenchemie. Isotopenpraxis, 11 Jahrgang, Heft 9.
64. RITTENBERG D. (1948) The preparation of gas samples for mass spectrometric isotope analysis. Ann. Arbor, p. 31.

65. BREMNER J.M., FUHO F. (1963) Tracer studies of the reaction of soil organic matter with nitrite. FAO/IAEA Report 337.
66. FAUST H. (1960) Untersuchungen über Mineral stoffabgabe einjähriger Pflanzen. Z. Pflanzenern, Düng.u.Bodenk., 90, 83-93.
67. FIEDLER D. and PROSCHK (1972) The determination of the nitrogen content and nitrogen ¹⁵N abundance by means of the nitrogen gaz, generated from inorganic and organic materials, Analytica Chemica Acta, 60.
68. POLAK H.L. et coll. (1966) Stability of hypobromite solutions. Talanta, 13, 715-724.
69. PERSCHKE and PROSCHK (1971) Improvements in the determination of nitrogen-15 in the low concentration range by emission spectroscopy. Anal. Chim. Acta. 53, 456-459.
70. DESATY D., Mc GRATH (1969) Mass spectrometric measurement of nitrogen-15 enrichment in nitrogen obtained by Dumas combustion. Anal. Biochem. 29, 122
71. PEARSE and GAYDON (1973) The identification of molecular spectra. Chapman and Hall, 3ème ed.
72. COOK G.B. et coll. (1967) Nature, 216, 475.
73. GOLEB I.A. and MIDDELBOE V. (1970) An accuracy and sensibility in Optical ¹⁵N Analysis. Applied Spectroscopy, 24, 406
74. BEYNON J.H. (1960) Mass spectrometry and its applications to organic chemistry. Elsevier publishing.
75. WALLER D. (1972) Biochemical applications of mass spectrometry. Willy Intersciences 1972.
76. KNAPP D. and GAFFNEY E. (19) Use of stable isotopes in pharmacology-clinical pharmacology. Clinical Pharmacology and Therapeutics, p. 307-316, vol. 13, 3.
77. SCHMIDT H.L. et coll. (1975) Bildung von nicht-äquilibriertem Stickstoff bei dynamischer Verbrennung ¹⁵N-markierter Verbindungen. Z. Anal. Chem. 274, 13-17
78. ZBARSKY S.H. et FISCHER J. (1949) The preparation of cyanamide, urea, and related compound labeled with long-lived radioactive carbon. Canadian Journal of Research, 27, sec. B, 81-85
79. BENAKIS A. (1964) Rapport C.E.A. No 2406, mars 1964
80. VOGEL A.I. (1967) A text-book of Practical Organic Chemistry Third ed. Longmans
81. OLESEN O.V. (1967) Determination of phenobarbital in serum in the presence of other barbiturates, sulfonamides, salicylates, and other interfering Drugs. The Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation, 20, no 1.

